

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

Actividad antibacteriana de la hemolinfa de *Penaeus vannamei* tras la administración
de un extracto de *Oreganum vulgare*

Código de Proyecto Integrador

VIDA-419

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Nombre de la titulación

Biólogo

Presentado por:

Katherine Marisol Duche Mañay

Guayaquil - Ecuador

Año: 2025

Dedicatoria

A Dios, por ser mi fortaleza día a día.

A mis abuelos (+) María y Pedro que me acompañan desde el cielo, y me enseñaron a nunca rendirme.

A mis padres, Enriqueta, Antonio y a mi hermano Allan, por su amor, sus sacrificios y por enseñarme que con esfuerzo y constancia los sueños se cumplen.

A mi Tía Elsa por su ayuda incondicional.

A mi novio José Luis Torres, por su amor sincero, paciencia, y por creer en mí cuando yo dudaba.

A mi maestra Patricia Galarza, por enseñarme a amar el arte de la danza.

A mis amigos Chukillantus, Gema, Christel, Gabriel, Alexandra, Liliana, Jhonnatan, Diego por su amistad, cariño y palabras de aliento día a día.

A mis amigos de CENAIM Anita, Cristina, Javi por adoptarme durante el proceso.

A mis criaturas gatunas, perrunos y a los michis por ser compañeritos de tesis cada madrugada.

Y en especial a esa pequeña Marisol que un día soñó con lograr grandes cosas y con recorrer camaroneras, hoy le dedico este logro que es la prueba de que los sueños, con esfuerzo y fe, sí se cumplen.

Agradecimientos

Un enorme agradecimiento a mi tutora de tesis, PhD. Jenny Rodríguez, por su guía, paciencia y apoyo constante, que hicieron posible que este proyecto se convirtiera en una experiencia de aprendizaje inolvidable.

Un reconocimiento especial a mi cotutora de tesis, MSc. Cecilia Tomalá, por su generosidad y dedicación, siempre dispuesta a corregirme y acompañarme en cada paso, brindándome confianza y motivación.

A la MSc. Anita Ayong, Tnlga. Rosita Malavé y Sr. Iván Gonzabay, por su apoyo, paciencia y disposición durante el proceso. Su ayuda hizo que cada desafío se sintiera más ligero y su acompañamiento llenó de confianza este camino.

A CENAIM y al set experimental por abrirme las puertas de este hermoso lugar frente al mar y permitirme trabajar en los laboratorios de Inmunología, Bioactividad y Microbiología, brindándome la oportunidad de aprender y crecer profesionalmente.

Finalmente, gracias infinitas a todas las personas maravillosas que conocí durante este proceso. Gané madres, hermanos, amigos, compañeros y profesionales a quienes admiro profundamente. Me siento inmensamente feliz de haber culminado este proyecto en CENAIM y ESPOL, lugares que siempre llevaré en mi corazón.

Declaración Expresa

Yo Katherine Marisol Duche Mañay acuerdo y reconozco que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí/nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al autor que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 20 de mayo del 2025.



Katherine Marisol Duche Mañay

Evaluadores

Luis Lenin Galarza Romero

Profesor de Materia

Jenny Antonia Rodríguez León

Tutor de proyecto

Resumen

El cultivo del camarón *Penaeus vannamei* enfrenta amenazas constantes por infecciones de *Vibrio spp.*, agentes causales de las vibriosis que generan elevadas mortalidades y pérdidas económicas en el sector acuícola. El uso indiscriminado de antibióticos ha promovido resistencia bacteriana y efectos negativos en el ambiente, lo que hace necesario evaluar alternativas sostenibles. En este estudio se determinó la capacidad inmunomoduladora de extractos acuosos de *O.vulgare*. Como pasos previos se determinó la dosis efectiva in vivo. Para esto se determinó la actividad antibacteriana de extractos de *O. vulgare* a distintas concentraciones *in vitro* (difusión en agar). Los extractos, fueron aplicados en diferentes concentraciones frente a tres vibrios evidenciándose halos de inhibición en función de la dosis, lo que confirmó un efecto dosis-dependiente atribuible a metabolitos fenólicos como timol y carvacrol. Los extractos también fueron evaluados por su efecto inmunomodulador *in vitro* (O2- y PO). El estudio incluyó la estandarización de un ensayo para evaluar la capacidad antibacteriana de la hemolinfa de camarón (plasma y extractos de hemocitos), contra tres de los vibrios patógenos encontrado que *V. campbelli* fue sensible a la hemolinfa, no así *V. parahaemolyticus*. Posteriormente, se realizó una validación en campo en camarones tratados con extractos de orégano y un grupo control no tratado. Los organismos expuestos al orégano presentaron reducción de activación de la fenoloxidasa pero no de la generación de anión superóxido. Estos camarones presentaron además mayor concentración de proteínas plasmáticas, así como mayor supervivencia. En conjunto, los resultados confirman la eficacia del orégano para inmunomodulador al camarón *P. vannamei*. Se necesitan estudios complementarios con cepas bacterianas de mayor sensibilidad a la hemolinfa de camarón para completar la estandarización del test antibacteriano.

Abstract

The culture of the shrimp *Penaeus vannamei* faces constant threats from infections by *Vibrio* spp., the causative agents of vibriosis, which generate high mortality and economic losses in the aquaculture sector. The indiscriminate use of antibiotics has promoted bacterial resistance and has had negative effects on the environment, making it necessary to evaluate sustainable alternatives. In this study, we determined the immunomodulatory capacity of aqueous extracts of *Oreganum vulgare*. As a preliminary step, the effective in vivo dose was determined. To this end, the antibacterial activity of *O.vulgare* extracts was determined at different concentrations in vitro (agar diffusion). The extracts were applied at different concentrations against three pathogenic vibrios, demonstrating inhibition zones depending on the dose, confirming a dose-dependent effect attributable to phenolic metabolites such as thymol and carvacrol. The extracts were also evaluated for their in vitro immunomodulatory effects (O2-y PO). This study included the standardization of an assay to evaluate the antibacterial capacity of shrimp hemolymph (plasma and hemocyte extracts) against the three pathogenic vibrio species. *V. campbellii* was found to be sensitive to the hemolymph, while *V. parahaemolyticus* was not. Field validation was subsequently performed on shrimp treated with oregano extracts and an untreated control group. Organisms exposed to oregano showed reduced phenoloxidase activation but not reduced superoxide anion generation. These shrimp also exhibited higher plasma protein concentrations and increased survival. Overall, the results confirmed the efficacy of oregano in immunomodulating *P. vannamei*. Further studies using bacterial strains with greater sensitivity to shrimp hemolymph are needed to complete the standardization of the antibacterial test.

INDICE

Dedicatoria	II
Agradecimientos	III
Declaración Expresa.....	IV
Evaluadores	V
Resumen.....	VI
<i>Abstract</i>	VII
Abreviaturas	XII
Simbologías.....	XIII
Capítulo 1	1
1. Introducción	2
1.1 Descripción del problema	3
1.2. Justificación.....	5
1.3. Objetivos	6
1.3.1 Objetivo General	6
1.3.2 Objetivos Específicos.....	6
1.4. Marco Teórico	6
1.4.1 Acuicultura a nivel global y en Ecuador	6
1.4.2. Cultivo de <i>P. vannamei</i> en Ecuador.....	8
1.4.3 <i>V. parahaemolyticus</i> como agente causante de la AHPND.....	8
1.4.4. Innunidad de <i>P.vannamei</i> o camarón blanco	9
1.4.4 Test y actividad antibacteriana	11

1.4.6 Extractos de <i>O. vulgare</i>	12
Capítulo 2.....	13
2. Metodología	14
2.1 Preparación del extracto de orégano	14
2.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de orégano	15
2.2.1 Cepas bacterianas y aislamiento.....	15
2.2.2 Crecimiento de la bacteria.....	16
2.2.3 Ensayo antibacteriano con bacterias incluidas en el agar	16
2.2.4 Determinación de la actividad antibacteriana del extracto de orégano	17
2.2.5 Método de difusión en laguna	17
2.2.6 Determinación de la capacidad inmunomoduladora del extracto de orégano	18
2.2.7 Estandarización de un método para medir la actividad antibacteriana del plasma	19
2.3 Bioensayo para determinar la actividad antibacteriana de camarones tratados con extracto de orégano.	19
2.3.1 Determinación de parámetros inmunitarios (O_2^- , activación de la PO) de camarones tratados con el extracto de orégano.....	22
2.3.3 Hemograma de camarones tratados con el extracto de orégano	22
2.3.4 Cuantificación de la concentración de proteínas plasmáticas en camarones tratados con el extracto de orégano.....	23
2.4 Test antibacteriano del plasma	23

Capítulo 3	24
3. Resultados y análisis	25
3.1 Efecto inmunoestimulante del extracto de <i>O. vulgare</i> en la generación de anión superóxido (O ₂ ⁻)	25
3.2 Efecto inmunoestimulante del extracto de <i>O. vulgare</i> en la activación de la PO	27
3.3 Eficacia del Extracto de Orégano frente a <i>Vibrio ssp.</i> patógenos	28
3.4 Formulación y composición del medio de cultivo hemolinfa	31
3.4.1 Desarrollo de un medio de cultivo similar a la hemolinfa para evaluar.....	32
3.5 Estandarización del test antibacteriano	33
3.6. Bioensayo en piscina: validación del protocolo de evaluación de la actividad antibacteriana de la hemolinfa del camarón.....	35
3.6.1 Generación de anión superóxido en camarones tratados y no tratados.....	36
3.6.2 Activación de la fenoloxidasa de camarones tratados y no tratados	37
3.6.3 Cuantificación de proteínas de camarones tratados y no tratados.....	38
3.6.4 Comparación de camarones tratados y no tratados mediante test antibacteriano	39
3.7 Análisis.....	41
Conclusiones y Recomendaciones	44
4. Conclusiones y recomendaciones	45
4.1 Conclusiones	45
4.2 Recomendaciones	46

5.	Referencias.....	48
----	------------------	----

Abreviaturas

AHPND	Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda
ANOVA	Análisis de varianza (Analysis of Variance)
C	Control (grupo sin tratamiento)
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
E.O	Extracto de orégano
FAO	Organización de Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura
IHHNV	Necrosis hipodérmica y hematopoyética
<i>P. vannamei</i>	Camarón blanco
SD	Desviación estándar (Standard Deviation)
T	Tratado o tratamiento
TSB	Caldo tripticasa de soya (Tryptic Soy Broth)
TSA	Agar tripticasa de soya
TSV	Virus del Síndrome de Taura
V	Vibrio
WSSV	Virus de la mancha blanca

Simbologías

°C	Grados Celsius
g	Gramo
h	Hora
mg	Miligramos
min	Minuto
ml	Mililitros
OD	Densidad óptica (Optical Density)

Índice de Tablas

Tabla 1	20
Tabla 2	21
Tabla 3	21
Tabla 4	22

Índice de Figuras

Figura 1 <i>Preparación del extracto de orégano</i>	14
Figura 2 <i>Filtración del extracto de orégano</i>	15
Figura 3 <i>Crecimiento bacteriano de tres especies de Vibrio en caldo TSB al 2 % de NaCl</i>	16
Figura 4 <i>Instalaciones de estación experimental CENAIM</i>	19
Figura 5 <i>Tasa de generación de anión superóxido inducida por extracto de orégano</i>	25
Figura 6 <i>Tasa de generación de anión superóxido inducida por extracto de O. vulgare</i>	26
Figura 7 <i>Activación de la fenoloxidasa del O. vulgare</i>	27
Figura 8 <i>Comparación de la actividad basal y estimulada de la fenoloxidasa respecto al extracto de orégano.</i>	27
Figura 9 <i>Halos de inhibición observados mediante el método de difusión en agar (laguna), utilizando extractos concentrados de orégano y sobrenadantes del extracto frente a Vibrio campbellii</i>	28
Figura 10 <i>Halos de inhibición observado mediante el método de difusión en agar (laguna), utilizando extracto concentrado de orégano y sobrenadante frente a V. harveyi</i>	29

Figura 11 Halos de inhibición observado mediante el método de difusión en agar (laguna), utilizando extracto concentrado de orégano y sobrenadante frente a <i>V. parahaemolyticus</i>	30
Figura 12 Composición Iónica y Bioquímica de la hemolinfa de las especies de camarón del género <i>Penaeus</i>	31
Figura 13 Composición de aminoácidos que se encuentran en la hemolinfa de las especies de camarón del género <i>Penaeus</i>	31
Figura 14 Medio de cultivo hemolinfa o MH	32
Figura 15 Efecto inhibitorio del plasma sobre <i>Vibrio</i> spp. utilizando medio hemolinfa.....	33
Figura 16 Efecto inhibitorio de los extractos de hemocitos sobre <i>Vibrios</i> spp. patógenos utilizando medio hemolinfa	34
Figura 17 Efecto inhibitorio integrando muestras de plasma y extractos celulares sobre vibrios utilizando medio hemolinfa	35
Figura 18 Generación de (O ₂ -) en camarones tratados y no tratados, en condiciones basales y estimuladas.....	36
Figura 19 Generación de O ₂ - estimulada y basal de camarones tratados y no tratados con extracto de orégano.	37
Figura 20 Activación de la fenoloxidasa (PO) en función del tratamiento	37
Figura 21 Comparación estadística de la concentración de proteínas totales entre camarones control y tratados con extracto de orégano.....	38
Figura 22 Porcentaje de inhibición de extractos de hemocitos contra tres vibrios patógenos frente a diferentes cepas de <i>Vibrio</i> según el tratamiento.....	40
Figura 23 Porcentaje de inhibición del plasma contra tres vibrios patógenos frente a diferentes cepas de <i>Vibrio</i> según el tratamiento.	40

Capítulo 1

1. Introducción

En la industria acuícola el control de enfermedades es un desafío que se vive día a día. Una de las amenazas principales dentro de la producción de *Penaeus vannamei*, especie fundamental en la acuicultura mundial, es causada por el *Vibrio parahaemolyticus* (Alejandra et al., 2023), *causante de* la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) por sus siglas en inglés). Este patógeno genera altas tasas de mortalidad y grandes pérdidas económicas en las granjas de camarón. Factores ambientales como la salinidad, la temperatura y la calidad del agua inciden directamente en la proliferación y virulencia de la bacteria (V. Kumar et al., 2021). Entre estos factores también se encuentra la respuesta inmune del camarón, la cual es determinante para la progresión de la enfermedad (Muñoz et al., 2000).

Para la prevención y el control de la AHPND se investigan diversas estrategias, como probióticos, prebióticos, mejoras en la calidad del agua, la aplicación de prácticas de bioseguridad, así como el uso de extractos naturales de plantas con efectos antibiótico, antitóxico e inmunopotenciadores (García-Bernal et al., 2020). Los extractos naturales como del orégano (*O. vulgare*) poseen compuestos bioactivos como el timol y el carvacrol, los cuales han demostrado efectos antibacterianos contra los vibrios (Cervato et al., 2000). Estos compuestos tienen propiedades bactericidas, antioxidantes, antiinflamatorias, y actúan interfiriendo con la estructura de la membrana celular de los agentes patógenos, favoreciendo la lisis celular y la inhibición del crecimiento bacteriano (Gracia-Valenzuela et al., 2022) .

Debido a sus propiedades inmunomoduladores los extractos de plantas pueden mejorar la respuesta inmune de los camarones, mejorar su salud y potencialmente, reducir las pérdidas económicas asociadas a enfermedades como las vibriosis. Este enfoque representa una estrategia ecológica prometedora para el cultivo de camarones (Aгурto-Rodríguez et al., 2022).

Este proyecto integrador busca proponer soluciones seguras para la regulación y prevención de bacterias del género *Vibrio*, responsables de graves problemas en la acuicultura. Se plantea además como técnica para evaluar el efecto inmunomodulador del orégano un protocolo in vitro para determinar la capacidad antibacteriana de la hemolinfa del camarón. El protocolo antibacteriano se validará evaluando la capacidad antibacteriana de la hemolinfa de camarones tratados con extracto de orégano. Se espera que los resultados aporten al diseño de alternativas comerciales más seguras y efectivas para la gestión del AHPND y otras vibriosis, fortaleciendo así la salud del cultivo de camarón mejorando la productividad y competitividad del sector camaronero ecuatoriano.

1.1 Descripción del problema

En los últimos 50 años, la acuicultura en Ecuador se ha consolidado en uno de los pilares más relevantes para la economía del país debido a que aproximadamente el 40% de las exportaciones ecuatorianas de camarón son fuentes de ingresos económicos (FAO, 2022). En los años 2021, 2022 la producción de camarón generó 848.000 toneladas métricas produciendo una ganancia de 5.323,30 millones de dólares, lo cual convierte al país en uno de los grandes exportadores del crustáceo a nivel mundial (FAO, 2022). Sin embargo, la producción camaronera se ve perjudicada por la presencia de múltiples agentes patógenos, tales como el Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV), el virus del Síndrome de Taura (TSV), el virus de la mancha blanca (WSSV) (V. Kumar et al., 2021).

Al mismo tiempo los crustáceos también se encuentran expuestos a diversas infecciones bacterianas siendo los vibrios los principales causantes de enfermedades reduciendo su tasa de supervivencia (Sampaio et al., 2022).

Los vibriones, son bacterias gramnegativas con lipopolisacáridos en su membrana externa constituyen patógenos bacterianos acuáticos agresivos que habitan en aguas cálidas que toleran diversas salinidades dentro de las cuales se incluyen agua dulce, salobres y marinas(Sampaio et al., 2022). El clado *harveyi* es significativo para la ecología acuática debido a su impacto en organismos y ecosistemas. Además, incluye especies bacterianas marinas como *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio campbellii* y *V. parahaemolyticus* responsables de enfermedades en camarones, peces y moluscos cultivados. Estas infecciones, se conocen como vibriosis, y son capaces de causar altas tasas de mortalidad en piscinas y acuarios, generando pérdidas económicas a nivel global en el sector acuícola (Darshanee Ruwandeeepika et al., 2012). *V. parahaemolyticus* es el principal causante de la AHPND la cual es una infección altamente contagiosa que afecta gravemente a los camarones, con tasas de mortalidad de hasta el 90% (Abdel-Latif et al., 2022) . Este vibrio tiene la capacidad de infectar a los hospedadores y evadir las respuestas inmunitarias del camarón, lo que facilita su proliferación en el organismo.

AHPND se manifiesta clínicamente a través de diversos signos como pérdida del apetito, retraso en el crecimiento, letargo, apatía, natación errática, atrofia de la hepatopáncreas, caparazón blando, intestino vacío y la presencia de manchas de melanización en la hepatopáncreas lesionada (R. Kumar et al., 2020). Dada la complejidad de los problemas económicos y el impacto negativo sobre el microbiota de los camarones, es de vital importancia promover tácticas, de prevención e inspección eficaces en los sistemas de cultivo (R. Kumar et al., 2020) . Entre las medidas más comunes se encuentran el uso de desinfectantes, cloro y antibióticos; sin embargo, el empleo excesivo e inadecuado de antibióticos ha favorecido la aparición de cepas bacterianas resistentes, disminuyendo la efectividad de los tratamientos y generando efectos adversos en los organismos. Como alternativa, se han propuesto opciones más sostenibles y amigables con el medio ambiente,

como el uso de probióticos, prebióticos, aditivos inmunomoduladores y extractos naturales de plantas ricas en compuestos bioactivos como el orégano (Abdel-Latif et al., 2022). Estas soluciones contribuyen al refuerzo del sistema inmune del camarón y ayudan a reducir la dependencia de productos químicos, representando un enfoque más seguro y eficiente frente a los desafíos sanitarios del sector acuícola.

1.2. Justificación

Este proyecto tiene como fin mejorar el sistema inmune del camarón evitando altas tasas de mortalidad causadas por *Vibrio spp.* fin de, impulsar el crecimiento económico de la acuicultura, para lo cual es fundamental adoptar un enfoque integral (Kazuñ et al., 2019). Ante el creciente impacto de las infecciones bacterianas por *Vibrios*, particularmente aquellas asociadas al AHPND, y la preocupación por el abuso de antibióticos en la producción acuicultura, se hace urgente identificar alternativas terapéuticas sostenibles (Kazuñ et al., 2019). En este contexto, los extractos de plantas constituyen una alternativa efectiva por sus compuestos bioactivos con efectos antimicrobianos, inmunomoduladores y antioxidantes., posicionándose como una opción estratégica y ecológicamente viable (Minjarez-Osorio et al., 2024). Su aplicación no solo contribuye al control biológico de patógenos, sino que también fortalece la respuesta inmune de los organismos acuáticos, ofreciendo una solución inmediata y natural frente al ataque de *Vibrios spp.* (Agurto-Rodríguez et al., 2022).

El uso de extractos de orégano (*O. vulgare*) representa una alternativa prometedora por ser ecológicamente amigable, de bajo costo y de fácil preparación a nivel local (*homemade*). Este tipo de soluciones se alinea con los productos que tienen la designación GRAS (por sus siglas en inglés), inocuos, ampliamente disponibles y accesibles para los seres humanos. Su efectividad se debe a la riqueza de compuestos bioactivos presentes en las plantas, como carvacrol y timol, conocidos por sus propiedades antimicrobianas. Estas

características hacen del orégano una opción viable para su aplicación en sistemas acuícolas como medida preventiva o de control ante brotes bacterianos, reforzando así el enfoque hacia una acuicultura más sostenible (Agurto-Rodríguez et al., 2022). Conjuntamente, estos productos pueden disminuir la mortalidad y aumentar la supervivencia de los camarones frente a infecciones es decir son capaces de mejorar el sistema inmune del animal. Esto se traduce en mayores ganancias para los productores mejorando así, la calidad de la producción acuícola en Ecuador.

1.3. Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Evaluar si el extracto de orégano (*O. vulgare*) tiene un efecto sobre la hemolinfa del camarón (*P. vannamei*) con el fin de establecer su potencial como agente inmunomodulador.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Identificar la concentración ideal del extracto de orégano para mejorar la respuesta inmune del camarón.
- Analizar la eficacia del extracto de orégano contra distintos vibrios patógenos de camarón, a fin de determinar la dosis antimicrobiana efectiva.
- Estandarizar un protocolo de evaluación de actividad antibacteriana de la hemolinfa de camarón
- Comparar la actividad antibacteriana del plasma de camarones tratados con extracto de orégano con el plasma de camarones no tratados.

1.4. Marco Teórico

1.4.1 Acuicultura a nivel global y en Ecuador

Según la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación), la acuicultura es una labor enfocada en la cría y cultivo de organismos acuáticos en el medio marino (FAO, 2022). El sector acuícola, según NG (National Geographic) es una actividad que comprende el crecimiento, cultivo y cosecha de especies acuáticas en ambientes de agua dulce y salada, con fines de consumo humano y conservación (National Geographic, 2025). A nivel global, la acuicultura ha experimentado un crecimiento constante, convirtiéndose en una fuente de producción de alimentos acuáticos de rápido desarrollo. Aproximadamente 114 millones de toneladas de camarón se produjeron a nivel mundial en el año 2020, siendo China el principal productor, seguido por India, Indonesia y Vietnam. Esta actividad desempeña un papel crucial en la seguridad alimentaria global, al proporcionar proteínas de alta calidad a millones de personas, especialmente en Asia, donde el pescado y el camarón constituye un componente esencial de la dieta (FAO, 2022). En Ecuador, la acuicultura representa una actividad económica estratégica, centrada en la producción y exportación de camarón blanco (*P. vannamei*), lo cual ha posicionado al país entre los principales productores a nivel mundial (Velásquez López et al., 2023).

Sin embargo, el avance de la acuicultura ha generado impactos negativos, como contaminación de efluentes, uso de antibióticos y sobre todo la pérdida de biodiversidad debido a la construcción de granjas camaroneras, lo cual ha incentivado el desarrollo de regulaciones (Velásquez López et al., 2023). Ante estos retos el Ecuador y los países exportadores e importadores han comenzado a promover tecnologías para la acuicultura como sistemas integrados, sistema de recirculación (RAS), y tecnologías que están orientadas a obtener eficacia productiva y así poder minimizar efectos negativos en el medio ambiente (Guevara Toscana et al., 2024). Estas estrategias favorecen a los recursos, debido a que reducen la dependencia de

insumos externos y fomentan la protección del medio ambiente acuático. Al mismo tiempo, el comercio internacional de productos acuícolas ha dinamizado las economías locales, generando empleo en diversas etapas de la cadena de valor (Guevara Toscana et al., 2024). En este contexto, la acuicultura se posiciona como una oportunidad estratégica para asegurar la seguridad alimentaria a nivel global, siempre que se desarrolle bajo un enfoque sostenible y con responsabilidad ambiental.

1.4.2. Cultivo de *P. vannamei* en Ecuador

En Ecuador, el camarón blanco del Pacífico (*P. vannamei*) es la especie más cultivada y tiene una gran importancia para la acuicultura nacional. Ecuador ocupa el segundo lugar como exportador de camarón a nivel mundial, compitiendo con países como Indonesia e India (Fernanda Alvarado-Barrera et al., 2024). La camaronicultura ha sido una industria que ha generado millones de dólares en ingresos, contribuyendo significativamente al producto interno bruto (PIB) nacional, así como a la creación de empleos. Si bien es cierto, que la industria camaronera es un pilar fundamental para la economía, también enfrenta desafíos los cuales están relacionados con la sostenibilidad ambiental (Ramón et al., 2024). Así ha enfrentado el aumento de los costos de producción, la caída de los precios internacionales del camarón y las restricciones impuestas durante la pandemia de COVID, sin embargo, la industria camaronera ecuatoriana ha logrado recuperarse. Su producción continúa en crecimiento y gracias a la alta demanda internacional y a la calidad del producto, Ecuador mantiene una sólida presencia en los mercados internacionales (Ramón et al., 2024).

1.4.3 *V. parahaemolyticus* como agente causante de la AHPND

V. parahaemolyticus es el principal causante de la AHPND en diversas especies de peneidos (Lee et al., 2015). Varios estudios confirman su virulencia a través de diversos mecanismos, incluyendo la producción de toxinas específicas PirA/PirB (tran) (Varela et al., 2020). El género *Vibrio spp.* forma parte del microbiota de los camarones de cultivo y lo hace colonizando las estructuras del tracto digestivo, las branquias y la cutícula. La infección se produce cuando especies de vibrios portadores de los genes de toxinas Pir A/B consiguen introducirse en el organismo colonizando el tracto digestivo y generando las toxinas que provocan alteraciones en el hepatopáncreas y una vacuolización de las células epiteliales del mismo órgano (Nelson Peña-Navarro, 2015). De ahí los vibrios se diseminan a otros órganos a través de la hemolinfa. De naturaleza sistémica, conforme la enfermedad progresa, la cutícula, el hepatopáncreas, el órgano linfático, la glándula antenal, el corazón se ven afectadas frecuentemente (Kongrueng et al., 2015). Tan pronto como un patógeno invade un cuerpo, este responde con una reacción del sistema inmunitario mediante la movilización de hemocitos hacia el sitio de infección y eventualmente, realiza la fagocitosis de los microorganismos, lo que crea una reacción inflamatoria. Sin embargo, con una acumulación significativa de patógenos en la cavidad corporal, la fagocitosis (la primera línea de defensa de una célula que "se come" al patógeno) no logra controlar la infección y el sistema de defensa del camarón crea nódulos hemocíticos. Se trata de una formación esférica de varias capas de hemocitos que rodean a los patógenos alrededor, bloqueándolos y contribuyendo a su eliminación (Varela et al., 2020).

1.4.4. Innunidad de *P. vannamei* o camarón blanco

A diferencia de los vertebrados los camarones poseen un sistema inmune innato para hacerle frente a las infecciones, por lo tanto, la modulación de sus

respuestas inmunitarias inmediatas o acorto plazo son fundamentales para el desarrollo de estrategias para prevenir y controlar enfermedades (Lotz, 1997). El sistema inmune del camarón es extremadamente susceptible a infecciones por bacterias del género *Vibrio ssp.* incluyendo *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii*, y *V. harveyi* (Lotz, 1997).

En los crustáceos, ciertas infecciones representan un alto riesgo al desencadenar una respuesta sistémica en el camarón, lo que compromete sus mecanismos de defensa inmune y facilita la progresión de la enfermedad (Lotz, 1997). Para evaluar la respuesta inmune del camarón es posible realizar mediciones de indicadores inmunes. Se analiza una muestra de la hemolinfa del camarón para determinar diversos parámetros de salud, incluyendo el número total de hemocitos y la eficacia de sus defensas, como la capacidad fagocítica, la actividad bactericida y la actividad de enzimas como la lisozima y el superóxido dismutasa. (Zhang et al., 2013). La respuesta inmune innata se compone de barreras físicas (cutícula, membrana peritrófica en camarón), hemocitos y respuesta humoral-celular debido a que incluye mecanismos de reconocimiento de patógenos, fagocitosis y producción de moléculas antimicrobianas (González et al., 2017).

Los hemocitos desempeñan un papel clave en la respuesta inmune, ya que intervienen en procesos como la fagocitosis, la formación de nódulos y la encapsulación de patógenos, así como la síntesis de compuestos antimicrobianos (González et al., 2017). Estas células cumplen funciones esenciales en el ámbito celular como en la humoral, liberando péptidos antimicrobianos, proteínas y otras sustancias bioactivas para combatir infecciones. Asimismo, participan en la coagulación y en la reparación de tejidos, contribuyendo a la protección general del organismo (González et al., 2017).

Los camarones peneidos activan la respuesta inmune humoral mediante la liberación de diversos compuestos antimicrobianos por parte de sus hemocitos (Kulkarni et al., 2021). Estos compuestos son péptidos antimicrobianos (AMPs por sus siglas en inglés) activos contra bacterias gramnegativas y grampositivas. Entre estos se encuentran péptidos de acción directa como las peneidinas, crustinas y los factores antilipopolisacáridos (ALF por sus siglas en inglés), los cuales actúan reconociendo estructuras bacterianas esenciales y ayudando a neutralizar patógenos invasores (Qiu et al., 2014) (Matos et al., 2023). Asimismo, la hemocianina, una proteína normalmente asociada al transporte de oxígeno, ha demostrado tener un papel clave en la inmunidad (Ingraham & Meyer, 1985). Su extremo C-terminal tiene actividad antimicrobiana, en tanto que su extremo N-terminal tiene actividad fenoloxidasas.

1.4.4 Test y actividad antibacteriana

Las pruebas de actividad antibacteriana tienen como finalidad examinar el efecto de determinados compuestos sobre el aumento de bacterias que comprometen la salud y el beneficio productivo de los crustáceos. (Natrah et al., 2025). Estas evaluaciones permiten determinar el grado de susceptibilidad de los microorganismos frente a diferentes sustancias con propiedades inmunes, lo que resulta crucial para crear estrategias efectivas controlar y prevenir enfermedades en la acuicultura. (Natrah et al., 2025). Los estudios han explorado diferentes compuestos antibacterianos derivados de la biota marina, el ácido lactobiónico y las bacteriocinas, extractos de plantas y cada uno de ellos ha demostrado diferentes grados de eficacia contra los patógenos (Natrah et al., 2025). Estos descubrimientos destacan la capacidad de los compuestos naturales y sintéticos para controlar las infecciones bacterianas en la acuicultura del camarón. La actividad antibacteriana se puede

evaluar con diferentes métodos como la difusión en agar, pocillos, lagunas las cuales constituyen técnicas semicuantitativas que permiten determinar la sensibilidad de microorganismos a diferentes sustancias antimicrobianas, antibióticos, extractos de plantas donde se crea una zona de inhibición alrededor de los extractos aplicados sobre bacterias patógenas (Rozirwan et al., 2018).

1.4.6 Extractos de *O. vulgare*

Los extractos de plantas medicinales son considerados una fuente prometedora de agentes antimicrobianos y antioxidantes inmunomoduladores. El extracto de orégano contiene compuestos fenólicos, como el carvacrol y el timol, que poseen efectos antimicrobianos y antioxidantes (Agurto-Rodríguez et al., 2022). El uso de extractos de orégano se considera una estrategia viable para la acuicultura puesto que contiene los elementos para impactar en la salud del camarón y fortalecer sus defensas naturales con el fin de reducir la dependencia de antibióticos y contribuir al desarrollo de una producción acuícola sostenible (Cervato et al., 2000). En comparación con los antibióticos sintéticos el extracto de orégano posee un bajo impacto ambiental (residuos biodegradables), sus dosis antioxidantes son subletales para las bacterias y no genera resistencia bacteriana. También los extractos poseen efectos anestésicos, capacidad de reducir la mortalidad, lesiones de los organismos acuáticos. Asimismo, ayudan a fortalecer el crecimiento y mejorar el rendimiento productivo en las granjas camaroneras (Gracia-Valenzuela et al., 2022).

Capítulo 2

2. Metodología

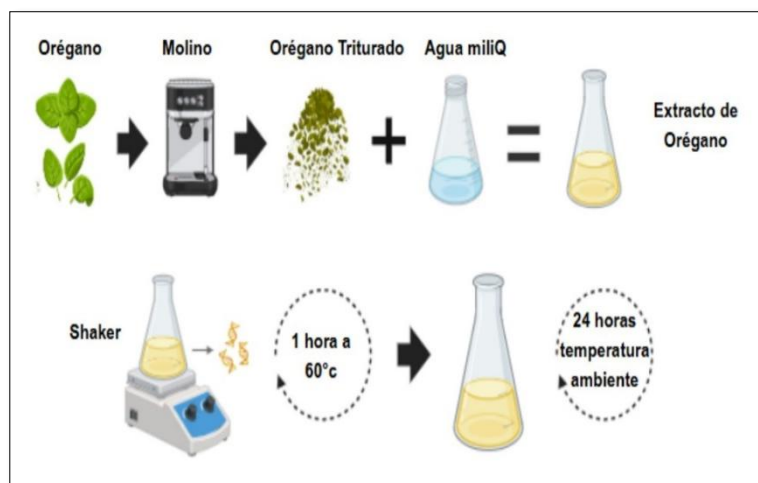
En primer lugar, se evaluó la dosis efectiva del extracto de orégano, siguiendo dos enfoques capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano y capacidad inmunomodulador. El extracto de orégano a dosis efectivas se aplicó en el alimento a camarones. Por lo que se procedió a realizar un diseño experimental en camaronera con un tratamiento (3 piscinas) y un control (3 piscinas) durante 8 días. Transcurrido este tiempo se evaluó el efecto sobre el sistema inmune mediante ensayos antibacterianos usando extractos de hemocitos y plasma. Como ensayos inmunológicos complementarios se realizó, hemograma análisis de generación de anión superóxido (O_2^-), activación de la fenoloxidasa (PO), concentración de proteínas plasmáticas.

2.1 Preparación del extracto de orégano

Para la preparación de extracto de orégano, se adecuó la metodología expuesta por (Blank et al., 2019), la cual consistió en obtener una relación de proporción de 1:10 (peso/volumen). Como primer paso, se trituraron 25 g (gramos) de orégano en un molino junto a 250 ml (mililitros) de agua miliQ como solvente. Posteriormente, el extracto fue transferido a una fiola y sometido a agitación en un incu-shaker (Modelo: Incu-Shaker Mini, Incu-Shaker 10L) durante 1 hora a una temperatura constante de 60 °C y una velocidad de 120 rpm. Finalmente, la fiola se dejó reposar a temperatura ambiente durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, el extracto fue filtrado utilizando filtros de café con un tamaño de poro de 42 μm (micras), con el fin de eliminar los residuos sólidos.

Figura 1

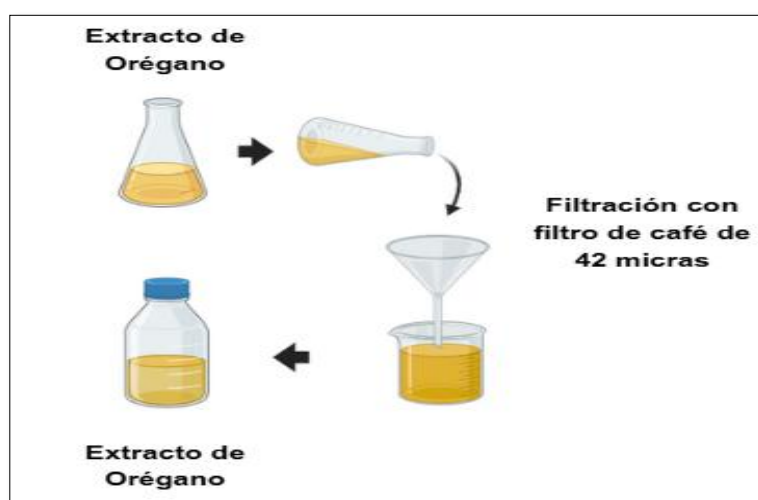
Preparación del extracto de orégano



Nota: Este gráfico corresponde a la preparación del extracto de orégano.

Figura 2

Filtración del extracto de orégano



Nota: Este gráfico corresponde a la filtración del extracto acuoso de orégano.

2.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de orégano

2.2.1 Cepas bacterianas y aislamiento

Las cepas bacterianas: *Vibrio harveyi* cepa E22, *Vibrio parahaemolyticus* (BA94C2) causante de (AHPND). Los vibrios fueron cultivadas en medio sólido Tryptic Soy Agar (TSA) enriquecido con CLNa al 2% de para optimizar su

crecimiento. Como siguiente paso se ejecutó el aislamiento donde se usó el método de estrías en cuadrantes. En el cual se coloca una pequeña porción del inóculo en este caso 50 µl (microlitros) en la placa Petri sobre la superficie del agar usando un patrón de zig-zag suave en cada uno de los cuadrantes con el uso del asa. Esta técnica permitió la dilución progresiva de la carga bacteriana, obteniéndose así colonias bien separadas e individuales tras el período de incubación.

2.2.2 Crecimiento de la bacteria

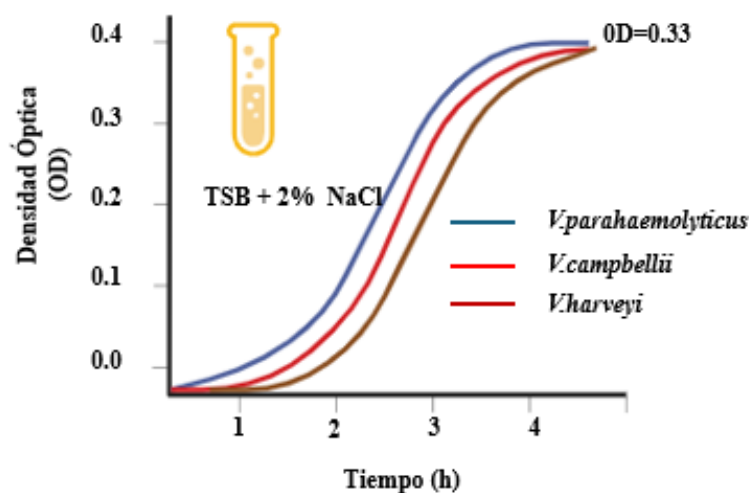
Una vez realizado el aislamiento bacteriano se preparó el crecimiento de los vibrios en caldo, para lo cual se usó un tubo de 9 ml de Tryptic Soy Broth (TSB) enriquecido con NaCl al 2% donde se colocó colonias de vibrios. El tubo del inóculo se agitó de 2 a 4 horas, dependiendo del vibrio a 150 rpm/minuto a temperatura de 30 °C grados hasta lograr la turbidez de 0.5 en la escala de McFarland (McFarland, 1907) lo que es equivalente a 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) ml⁻¹ y en densidad óptica (OD₆₀₀) de 0,333 para *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii*, *V. harveyi*.

2.2.3 Ensayo antibacteriano con bacterias incluidas en el agar

Se prepararon 40 ml de caldo soya tripticaseína (Tryptic Soy Broth, TSB) enriquecido con ClNa al 2% en fiolas individuales. Cuando el agar se enfrió si llegar a estar sólido, se añadieron 500 µL del cultivo bacteriano a una concentración de 1×10^6 UFC/ml. Finalmente, se colocó en las cajas Petri el medio de cultivo con las bacterias incluidas y se esperó hasta que la placa Petri se encuentre sólida.

Figura 3

Crecimiento bacteriano de tres especies de Vibrio en caldo TSB al 2 % de ClNa



Nota: La figura muestra la curva de crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus*, *V. campbellii* y *V. harveyi* en medio TSB. El crecimiento se representa como aumento en la densidad óptica (OD) a lo largo de 4 horas, alcanzando un valor de OD $\approx 0,333$

2.2.4 Determinación de la actividad antibacteriana del extracto de orégano

Debido a la presencia de sedimentos en el extracto concentrado de orégano, se evaluó su efecto mediante dos tratamientos: uno utilizando el extracto sin centrifugar, y otro a partir del sobrenadante y pellet obtenidos tras centrifugación. Esta diferencia permitió comparar la posible influencia de los compuestos insolubles presentes en el extracto. Para los tipos de extracto, se prepararon tres diluciones seriadas (1:10), con el objetivo de evaluar el efecto antibacteriano en función de la concentración del extracto, desde la forma más concentrada hasta la más diluida.

2.2.5 Método de difusión en laguna

Se empleó la técnica de difusión en laguna para analizar la actividad antibacteriana del extracto de orégano y el sobrenadante como se explicó previamente frente a las cepas bacterianas de los vibrios: *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* y *V. campbellii*. Para esto se colocaron 20 μ L de extracto de orégano y sobrenadante con

las diferentes diluciones seriadas, las cuales se realizaron con un asa triangular digraslki y se dejó secar en condiciones estériles. Como parte final se incubó por 24 horas a 30 °C (Balouiri et al., 2016).

2.2.6 Determinación de la capacidad inmunomoduladora del extracto de orégano

La hemolinfa se extrajo del seno ventral, localizado en la base del primer segmento abdominal, utilizando una jeringa de 1 ml que contenía 100 µL de una solución de citrato de sodio al 10% (Muñoz et al., 2000). La cuantificación del anión superóxido (O₂⁻) se realizó mediante la técnica de reducción del nitro azul de tetrazolio (NBT). El ensayo se llevó a cabo en microplacas de 96 pocillos. Para inducir el estallido respiratorio, se utilizó acetato de miristato de forbol (PMA, Sigma) disuelto en dimetilsulfóxido a una concentración de 30 µg mL⁻¹ (Muñoz et al., 2000). La producción de O₂⁻ se evaluó tanto en condiciones estimuladas y sin estimular con PMA. Los resultados se expresaron como una relación, obtenida al dividir la densidad óptica (medida a 620 nm) de la muestra estimulada con PMA sobre la densidad óptica de la misma muestra sin estimulación.

Para la prueba de activación de la PO, la muestra de hemolinfa fue centrifugada durante de 10 minutos a 4000g a una temperatura de 4 °C. El precipitado alcanzado se resuspendió en tampón Tris (15 mM) a una concentración de 10×10^6 células/ml. Esta suspensión se centrifugó nuevamente durante 5 minutos a 12000 rpm, también a 4 °C. El sobrenadante resultante, correspondiente al lisado celular de los hemocitos fue recolectado y almacenado a -20 °C por un máximo de una semana para su posterior análisis.

Para el ensayo enzimático, se distribuyeron 50 µl del sobrenadante en una microplaca de 96 pozos, en triplicado. Se prepararon dos grupos experimentales: uno con laminarina y otro sin ella. A cada pocillo se adicionaron 50 µl de solución reactiva, (Tris 15 mM, Clca 1 mM), con y sin laminarina. Las microplacas se pusieron en una incubadora a temperatura

ambiente y se dejaron allí durante 75 minutos. Una vez mediado este tiempo, se añadió a cada pocillo 50 µl de una solución de L-Dopa (3 mg de L-Dopa en 1 ml de tampón Tris 15 mM). La placa se incubó nuevamente por 10 minutos a temperatura ambiente, protegida de la luz. Finalmente, la concentración del metabolito resultante se determinó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm utilizando un lector de microplacas.

2.2.7 Estandarización de un método para medir la actividad antibacteriana del plasma

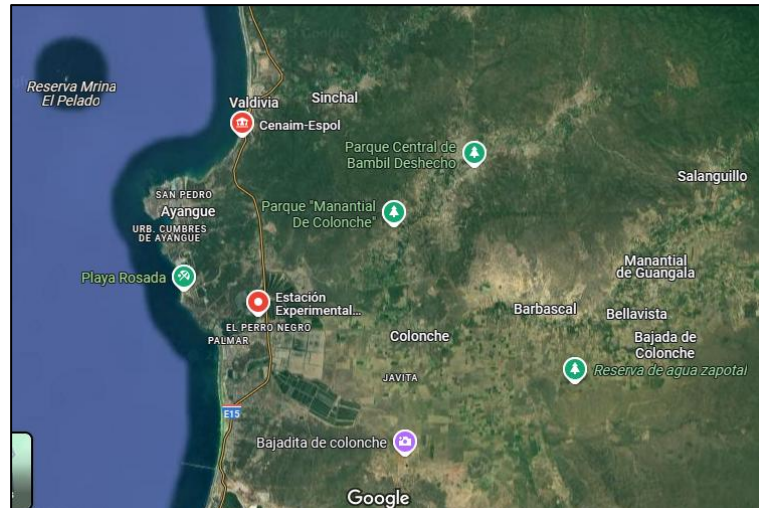
Este método se basó en el protocolo descrito por Gullian et al (2004) con algunas modificaciones. El ensayo se estandarizó para tres vibrios patógenos de camarón (*V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*) usando el plasma y un extracto de hemocitos, obtenidos mediante el procedimiento descrito para la activación de la PO. A fin de no estresar a los vibrios del control negativo, en lugar de reemplazar el plasma o el extracto de hemocitos, se utilizó un medio de cultivo diseñado con una composición similar en iones, proteínas y aminoácidos similar a la hemolinfa de camaron (medio hemolinfa).

2.3 Bioensayo para determinar la actividad antibacteriana de camarones tratados con extracto de orégano.

El experimento se realizó en 6 piscinas de tierra de 400 m² en la estación experimental de CENAIM-ESPOL, que se encuentra ubicada en Palmar a 150 km de la ciudad de Guayaquil, durante 8 días.

Figura 4

Instalaciones de estación experimental CENAIM



Nota: Mapa obtenido de Google Maps donde se observa la ubicación geográfica de la estación experimental de CENAIM. Fuente: Google Maps, 2025

El alimento aplicado a las piscinas tratadas se humedeció con 40 ml de extracto acuoso de orégano concentrado/k de alimento (dilución de 25 veces) y se recubrió con 30 ml de aceite de pescado a fin de evitar la lixiviación del extracto de orégano. El alimento de las piscinas del control solo fue recubierto con aceite de pescado. Para evitar que el extracto vegetal afectara negativamente a la microflora, estos extractos se aplicaron de manera alternada con el probiótico Ps 17 (*Pseudovibrio denitrificans*). En la mañana se aplicó el tratamiento con el extracto y en la tarde el probiótico, durante los 8 días que duro el ensayo. Al finalizar, se seleccionaron al azar 20 individuos por piscina para llevar a cabo los análisis realizando 2 réplicas de 10 camarones por cada piscina.

Tabla 1

Aplicación y dosificación del extracto de orégano concentrado en las piscinas en el horario matutino

Piscinas	Tratamiento	Alimento (g)	Extracto de Orégano (ml)	Aceite de Pescado (ml)
B17	T1	450	50	13,33
B16	T2	450	50	13,33
B20	T3	450	50	13,33
		1350	150	39,99

Tabla 2

Aplicación y dosificación de los controles de las piscinas en el horario matutino

Piscinas	Controles	Alimento (g)	Aceite de Pescado (ml)
B11	CT1	450	8,33
B13	CT2	300	8,33
B21	CT3	450	8,33
		1200	24,99

Tabla 3

Aplicación y dosificación de los tratamientos de las piscinas en el horario vespertino

Piscinas	Tratamiento	Alimento (g)	Probiótico Ps 17 (<i>P. denitrificans</i>) (ml)
-----------------	--------------------	---------------------	--

B17	T1	450	13,33
B16	T2	450	13,33
B20	T3	450	13,33
		1350	39,99

Tabla 4

Aplicación y dosificación de los tratamientos de las piscinas en el horario vespertino

Piscinas	Tratamiento	Alimento (g)	Probiótico Ps 17 (<i>P. denitrificans</i>) (ml)
B11	CT1	450	8,33
B13	CT2	300	8,33
B21	CT3	450	8,3
		1200	24,99

2.3.1 Determinación de parámetros inmunitarios (O_2 , activación de la PO) de camarones tratados con el extracto de orégano

Para analizar el impacto de concentraciones del extracto de orégano sobre el sistema inmune del camarón, se midió la generación de O_2 - en las células de la sangre del camarón (hemocitos, y la activación de la PO siguiendo los procedimientos descritos previamente

2.3.3 Hemograma de camarones tratados con el extracto de orégano

Se colocaron 10 μ L de hemocitos fijados con formaldehído al 3,7 % en un hemocitómetro (Cámara de Neubauer) y se procedió a contar, y clasificar los

hemocitos en granulados, semigranulosos y hialinos utilizando un microscopio óptico con dispositivo de contraste de fases.

2.3.4 Cuantificación de la concentración de proteínas plasmáticas en camarones tratados con el extracto de orégano

Para la estimación de proteínas plasmáticas se siguió el método de Lowry (LOWRY et al., 1951) adaptado a microplacas de acuerdo con el protocolo descrito por Gulliam, 2006 (Noble & Bailey, 2009) se utilizó una solución estándar de seroalbúmina bovina (BSA) (Waterborg & Matthews, 2003).

2.4 Test antibacteriano del plasma

El principio en el cual se fundamenta este protocolo es medir la turbidez de suspensiones bacterianas. Para ello, se miden las suspensiones bacterianas con y sin la adición de plasma de camarón. (Gullian et al., 2004, Acebo-González & Hernández-García, 2013) .Como primer paso, se realizó la siembra de los vibrios (*V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. campellii*), en caja Petri, y se prepararon los inóculos como ya describió previamente. La muestra de plasma igualada V/V con citrato de Na 10%, se distribuyeron en cuatro réplicas en microplaca, 25 µl por pozo, de igual manera se colocó el control negativo para plasma (Sol. de Citrato de Na y Medio Hemolinfa) y control negativo para extracto de hemocitos (Tris 15mM y Medio Hemolinfa). Asimismo, se coloca el control positivo (Sol. de Citrato de Na y antibiótico v/v). Se añadieron, 25 µl de suspensión bacteriana en todos los pocillos. Luego de 1h de incubación a temperatura ambiente, se adicionaron 150 µl de medio L.B. y se realizó la primera lectura (t=0) en el lector de microplacas a 620 nm. Incubamos a 30 °C por 4 h realizando lecturas cada 2 horas es decir t2=2h, t4=4h. La actividad antibacteriana se mide como un porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano. El control negativo corresponde al 100% del crecimiento bacteriano.

Capítulo 3

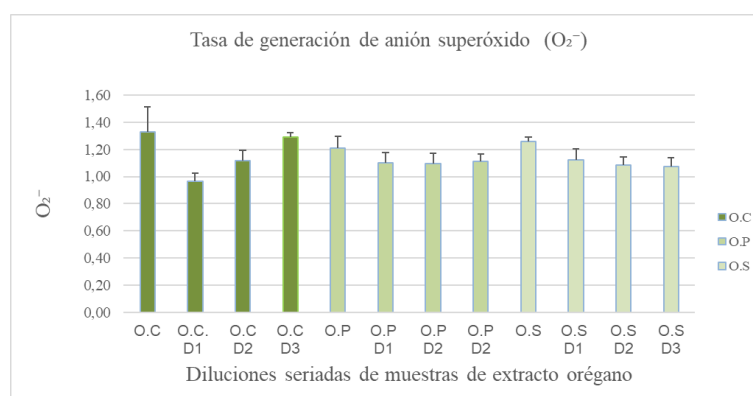
3. Resultados y análisis

El estudio evaluó el efecto del extracto de *O. vulgare* sobre la respuesta inmune de *P. vannamei* y su actividad antibacteriana frente a cepas patógenas de *Vibrio* spp. Los resultados obtenidos muestran que los extractos tuvieron actividad antibacteriana e influyeron en la respuesta inmune in vitro, evidenciando su potencial para ser usados en piscina como alternativa natural en la camaronicultura.

3.1 Efecto inmunoestimulante del extracto de *O. vulgare* en la generación de anión superóxido (O_2^-)

Figura 5

Tasa de generación de anión superóxido inducida por extracto de orégano



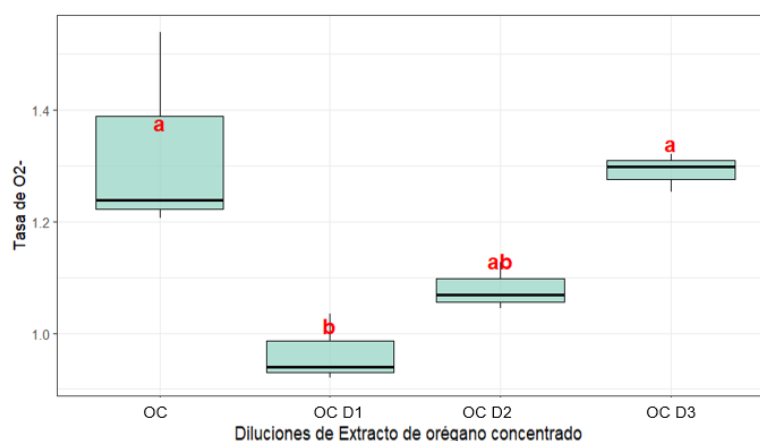
Nota: Tasa de generación de anión superóxido (O_2^-) en diferentes diluciones seriadas OC es dilución es 1/10, D2 es dilución 1/100, D3 es dilución 1/1000) de extracto de orégano, comparando tres presentaciones del extracto de orégano: O.C (orégano concentrado), O.P (orégano pellet) y O.S (orégano sobrenadante).

La figura 5 muestra la producción de (O_2^-) la cual varió en función de la concentración del extracto de orégano evaluado. El extracto completo de orégano (O.C) indujo la mayor tasa de generación de (O_2^-), alcanzando valores superiores a 1,2 en todas las diluciones y manteniendo una respuesta inmunoestimulante significativa desde la dilución

1/10. Los tratamientos O.P y O.S exhibieron valores más bajos, sin alcanzar los niveles del O.C, lo que indica una mayor capacidad antioxidante. Esto sugiere que la composición integral del extracto completo potencia la actividad biológica, asegurando un equilibrio entre la producción de especies reactivas y la respuesta inmune sin efectos supresores.

Figura 6

*Tasa de generación de anión superóxido inducida por extracto de *O. vulgare**



Nota: Tasa de generación de anión superóxido (O₂⁻) en diferentes diluciones seriadas del extracto de orégano concentrado (OC) donde OC D1 es dilución 1/10, OC D2 es dilución 1/100, OC D3 es dilución 1/1000. Las letras distintas (a, b) indican diferencias significativas.

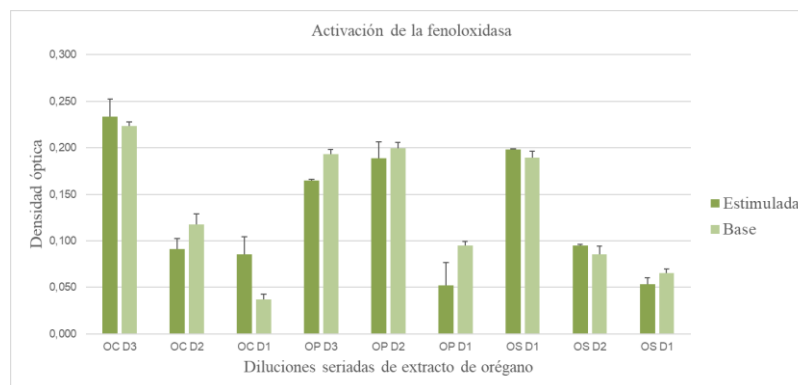
Como se puede observar en la figura 6, se evidencia que la dilución CO D1 del extracto de orégano concentrado reduce significativamente la producción de (O₂⁻) en comparación con el resto de las diluciones, sugiriendo un efecto antioxidante eficaz a esta concentración. Se seleccionó la dilución OC D1 para los ensayos posteriores debido a que presentó la mayor reducción significativa en la tasa de O₂⁻, manteniendo consistencia en la respuesta y sin indicios de efectos adversos. Esta concentración se consideró óptima, ya que se logró un balance entre eficacia antioxidante y seguridad, evitando así, el uso de

concentraciones más elevadas que podrían resultar menos eficientes o incrementar el riesgo de toxicidad.

3.2 Efecto inmunoestimulante del extracto de *O. vulgare* en la activación de la PO

Figura 7

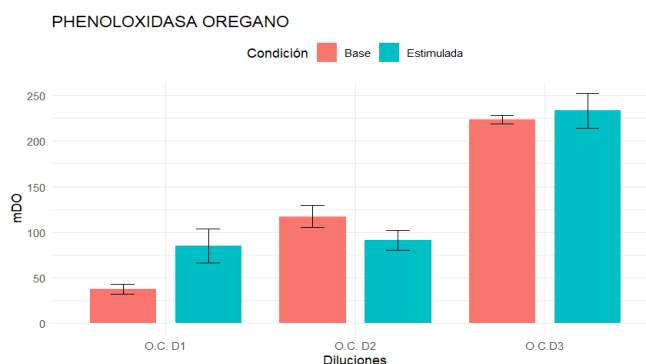
Activación de la fenoloxidasa del O. vulgare



Nota: La activación de la PO en diferentes diluciones seriadas (1/10, 1/100, 1/1000) de extracto de orégano, comparando tres tratamientos: O.O (orégano completo), O.P (orégano pellet) y O.S (orégano sobrenadante).

Figura 8

Comparación de la actividad basal y estimulada de la fenoloxidasa respecto al extracto de orégano.



Nota: La activación de la fenoloxidasa (mDO) en tres diluciones del extracto concentrado de orégano: D1 es dilución 1/10, D2 es dilución 1/100 y D3 es dilución 1/1000, evaluada bajo

condiciones basales (barras rojas) y estimulada (barras azules). Se observa un aumento progresivo en la actividad enzimática desde D1 hasta D3, alcanzando los valores más altos en la D3.

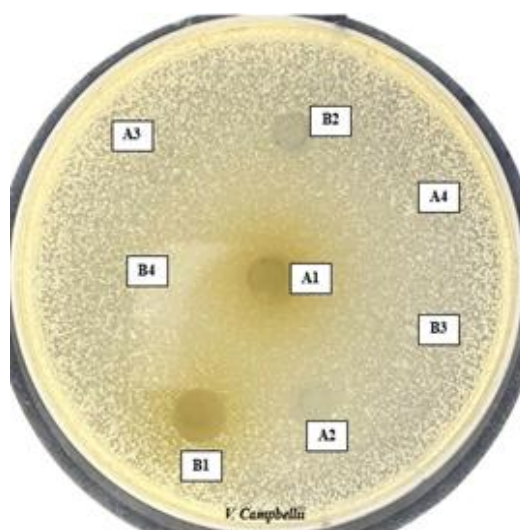
En la figura 8 se observa una tendencia creciente en la actividad feniloxidasasa a medida que se avanza de las diluciones D1 a D3, destacando especialmente en la dilución D3, donde se registran los valores más altos de actividad tanto en condiciones basales como estimuladas. Esta tendencia indica un potente efecto antioxidante en las diluciones más concentradas. Además, las condiciones estimuladas (barras azules) muestran consistentemente niveles superiores o comparables a los basales, lo cual indica que el efecto antioxidante del extracto de orégano no interfiere completamente con activación defensiva del parámetro inmune.

3.3 Eficacia del Extracto de Orégano frente a *Vibrio ssp.* patógenos

En la siguiente fase, se evaluó la eficacia antimicrobiana del extracto de orégano frente a diferentes cepas patógenas del género *Vibrio*, se realizaron pruebas de inhibición in vitro contra *V. harveyi*, *V. campbellii* y *V. parahaemolyticus*, empleando distintas diluciones del extracto.

Figura 9

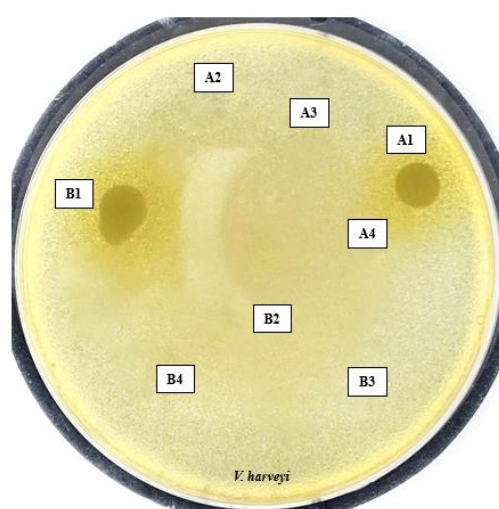
*Halos de inhibición observados mediante el método de difusión en agar (laguna), utilizando extractos concentrados de orégano y sobrenadantes del extracto frente a *Vibrio campbellii**



Nota: A1 y B1 corresponden a la concentración original (sin diluir) del extracto de orégano y del sobrenadante, respectivamente. A2 y B2 representan diluciones 1:10, A3 y B3 diluciones 1:100, y A4 y B4 diluciones 1:1000. Se observa una mayor zona de inhibición en los tratamientos con mayor concentración (A1 y B1), disminuyendo progresivamente con cada dilución.

Figura 10

Halos de inhibición observado mediante el método de difusión en agar (laguna), utilizando extracto concentrado de orégano y sobrenadante frente a V. harveyi

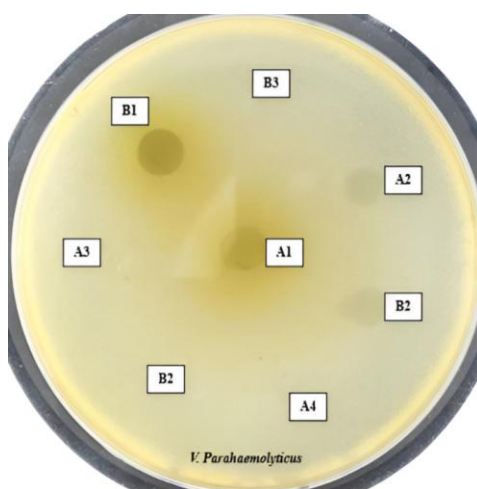


Nota: A1 y B1 corresponden a la concentración original (sin diluir) del extracto de orégano y del sobrenadante, respectivamente. A2 y B2 representan diluciones 1:10, A3 y B3 diluciones

1:100, y A4 y B4 diluciones 1:1000. Se observa una mayor zona de inhibición en los tratamientos con mayor concentración (A1 y B1), disminuyendo progresivamente con cada dilución.

Figura 11

*Halos de inhibición observado mediante el método de difusión en agar (laguna), utilizando extracto concentrado de orégano y sobrenadante frente a *V. parahaemolyticus**



Nota: A1 y B1 corresponden a la concentración original (sin diluir) del extracto de orégano y del sobrenadante, respectivamente. A2 y B2 representan diluciones 1:10, A3 y B3 diluciones 1:100, y A4 y B4 diluciones 1:1000. Se observa una mayor zona de inhibición en los tratamientos con mayor concentración (A1 y B1), disminuyendo progresivamente con cada dilución.

Como se observa en las Figuras 9, 10 y 11, la actividad antimicrobiana del extracto de orégano varía en función de la concentración aplicada. Se registró una mayor inhibición del crecimiento bacteriano en *V. campbellii*, *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* cuando se utilizaron las diluciones más concentradas del extracto completo de orégano OC (orégano completo) y OC (orégano completo diluido 1/10).

De manera similar, las diluciones de extracto de orégano O.S (orégano sobrenadante) y O.S (orégano sobrenadante diluido 1/10) también mostraron efectos inhibitorios, aunque en menor medida. Estos resultados indican que las concentraciones más altas del extracto poseen un mayor efecto antibacteriano. Esta diferencia sugiere una especificidad en la sensibilidad bacteriana al extracto, probablemente relacionada con características propias de la membrana bacteriana o mecanismos de resistencia.

3.4 Formulación y composición del medio de cultivo hemolinfa

Figura 12

Composición Iónica y Bioquímica de la hemolinfa de las especies de camarón del género Penaeus

Artículos científicos	Componentes									Referencia
	Na	Ca	K	Mg	Cl	HCO ₃	Taurina	Unidad	Proteína	
<i>Penaeus stylirostris</i>	365,7	3,96	8,4	4,52	366,5		0,799	mmol	70–100 mg/mL	Vargas-Albores et al., 1998
<i>Litopenaeus vannamei</i>	234,1	8,1	8,65					mmol		Shimizu et al. (2001)
<i>Penaeid shrimp</i>	140	3,5	15	2	140	15	0,5402	mmol		Yepiz-Plascencia et al., 2020

Nota: Composición de la concentración de componentes claves en la hemolinfa de diferentes especies de camarón del género *Penaeus*, expresadas en Mm. Se incluyen los principales iones como Na⁺, Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺, Cl⁻, HCO₃⁻, así como aminoácidos (taurina y prolina) y glucosa, según lo reportado en estudios previos. Esta información sirve como referencia fisiológica para la formulación de medios de cultivo similar a la hemolinfa.

Figura 13

Composición de aminoácidos que se encuentran en la hemolinfa de las especies de camarón del género Penaeus

Aminoácido	mg/L	mmol/L	Referencias
Lisina	46.4	0.317	Shimizu et al, 2001 - Tao et al, 2001
Arginina	34.8	0.200	
Valina	16.2	0.138	
Leucina	14.5	0.111	
Treonina	10.5	0.088	
Histidina	8.1	0.052	
Isoleucina	6.6	0.050	
Fenilalanina	5.5	0.033	
Metionina	3.7	0.025	
Glutamina	119.1	0.815	
Prolina	69.0	0.599	
Alanina	37.9	0.425	
Glicina	16.7	0.222	
Asparagina	12.2	0.092	
Tirosina	11.1	0.061	
Serina	9.3	0.088	
Ácido glutámico	7.7	0.052	
Ácido aspártico	2.3	0.017	
Halcistina	1.8	0.015	
Taurina	67.6	0.540	

3.4.1 Desarrollo de un medio de cultivo similar a la hemolinfa para evaluar

Figura 14

Medio de cultivo hemolinfa o MH



Nota: Medio de cultivo hemolinfa utilizado para crecimiento de bacterias en pruebas antibacterianas *in vitro*.

Se desarrolló un medio de cultivo experimental similar en composición a la hemolinfa, fundamentado en una revisión exhaustiva de la literatura científica sobre la composición fisiológica de la hemolinfa del camarón como se observa en la figura 12 y 13. El objetivo fue formular un medio de cultivo que recreara las condiciones iónicas, nutricionales y osmóticas necesarias para mantener la viabilidad y funcionalidad de los de las bacterias. La

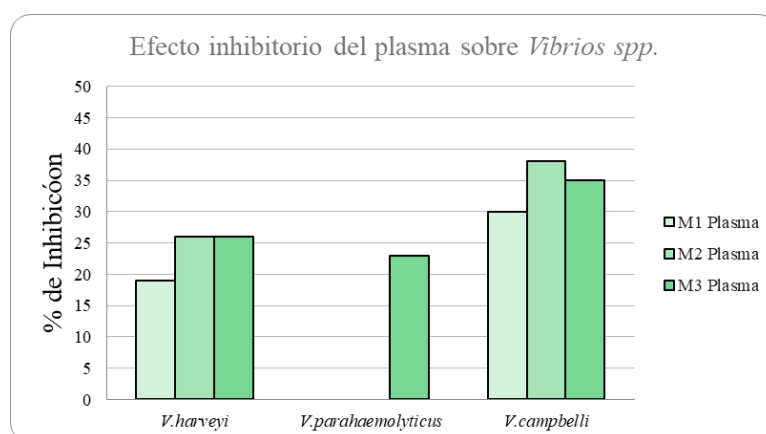
formulación tuvo en cuenta la necesidad de que el medio permitiera un crecimiento bacteriano controlado, ya que esto es esencial para simular ambientes de infección durante los ensayos inmunológicos.

Los resultados mostraron que el medio formulado facilitó el crecimiento de bacterias patógenas del género *Vibrio spp.* La capacidad del medio para soportar tanto el crecimiento bacteriano como la actividad inmune celular sugiere que es una herramienta prometedora para futuros estudios sobre la interacción hospedero-patógeno.

3.5 Estandarización del test antibacteriano

Figura 15

Efecto inhibitorio del plasma sobre Vibrio spp. utilizando medio hemolinfa



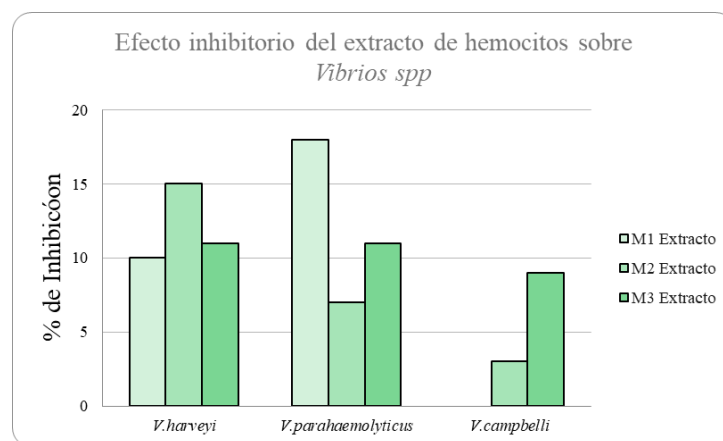
Nota: Porcentaje de inhibición bacteriana de tres muestras de plasma contra tres especies de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* y *V. campbellii*): M1 corresponde a la muestra 1, M2 muestra 2 y M3 muestra 3.

El análisis de la actividad antibacteriana del plasma mostró una clara capacidad de inhibición frente a las diferentes especies de *Vibrio* evaluadas. En general, se observó que *V. campbellii* fue la bacteria más susceptible, con porcentajes de inhibición que alcanzaron hasta un 38% en la muestra M2, seguido de *V. harveyi*, cuya inhibición fue más consistente en M2 (muestra) y M3 (muestra) (26%), mientras que M1 (muestra) mostró valores más bajos

(~19%). En contraste, *V. parahaemolyticus* resultó ser la cepa menos afectada. Estos resultados sugieren que el plasma contiene factores solubles con efecto antimicrobiano, cuya eficacia puede variar según el medio de cultivo y la especie bacteriana. La proteína respiratoria muy abundante en el plasma posee efecto antibacteriano en la región C-terminal (Destoumieux-Garzón et al., 2001).

Figura 16

Efecto inhibitorio de los extractos de hemocitos sobre Vibrios spp. patógenos utilizando medio hemolinfa

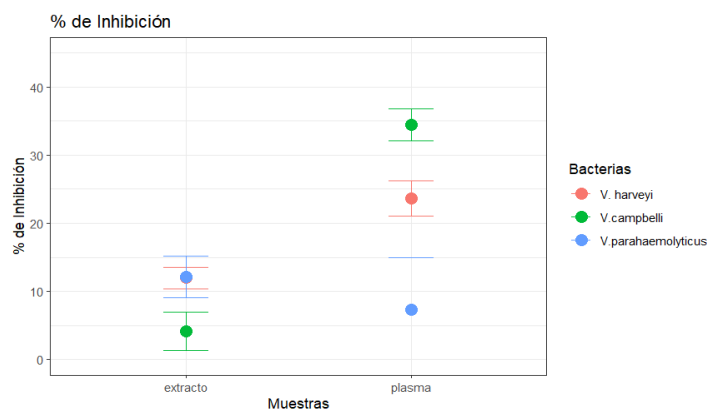


Nota: Porcentaje de inhibición bacteriana del extracto de hemocitos contra tres especies de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* y *V. campbellii*) en 3 muestras de plasma donde M1 corresponde a la muestra 1, M2 muestra 2 y M3 muestra 3.

Se evaluó la fracción celular mediante extracto de hemocitos. Los niveles de inhibición fueron menores en comparación con el plasma. *V. parahaemolyticus* fue la especie más afectada por el extracto en la muestra M1, alcanzando hasta un 18% de inhibición, mientras que *V. harveyi* mostró una respuesta intermedia y *V. campbellii* fue la más resistente. La menor actividad antimicrobiana con respecto al plasma puede estar relacionada a una menor concentración de péptidos antimicrobianos en los hemocitos, que hemocianina en el plasma.

Figura 17

Efecto inhibitorio integrando muestras de plasma y extractos celulares sobre vibrios utilizando medio hemolinfa



Nota: Comparación del porcentaje de inhibición del plasma y extracto de hemocitos frente a tres cepas de *Vibrios* como *V.* Los datos incluyen medias y desviaciones estándar.

Al comparar directamente la actividad antimicrobiana del plasma frente a los extractos de hemocitos, se confirma que el plasma ejerce una mejor inhibición contra todas las especies de *Vibrio*. *V. campbellii* fue consistentemente la más sensible al plasma, mientras que *V. parahaemolyticus* fue más sensible al extracto de hemocitos que al plasma, sugiriendo una posible sensibilidad diferencial a componentes celulares. Los datos también muestran menor variabilidad en los tratamientos con plasma, reflejada en menores desviaciones estándar. En conjunto, estos hallazgos destacan al plasma como eficiente en la respuesta antimicrobiana, probablemente debido proteínas activas en la inmunidad innata del camarón, como la hemocianina.

3.6. Bioensayo en piscina: validación del protocolo de evaluación de la actividad antibacteriana de la hemolinfa del camarón

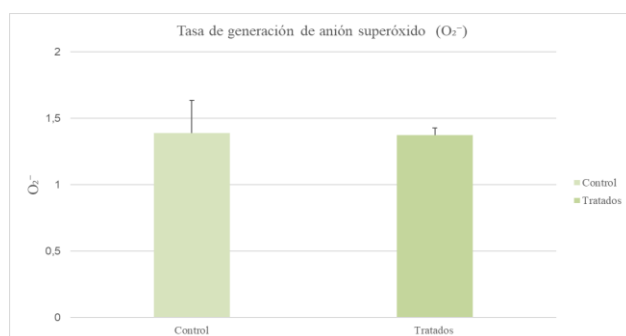
Finalmente se evaluaron cuatro parámetros inmunológicos claves de camarones tratados y no tratados con extracto de órgano provenientes de piscinas

experimentales. Estos parámetros fueron producción de O_2^- , activación de la PO, concentración de proteínas totales y actividad antibacteriana del plasma y extractos de hemocitos. La comparación de ambos grupos permitió identificar posibles mejoras en la respuesta inmune y capacidad antimicrobiana asociadas al uso del orégano como suplemento funcional.

3.6.1 Generación de anión superóxido en camarones tratados y no tratados

Figura 18

Generación de O_2^- en camarones tratados y no tratados, en condiciones basales y estimuladas



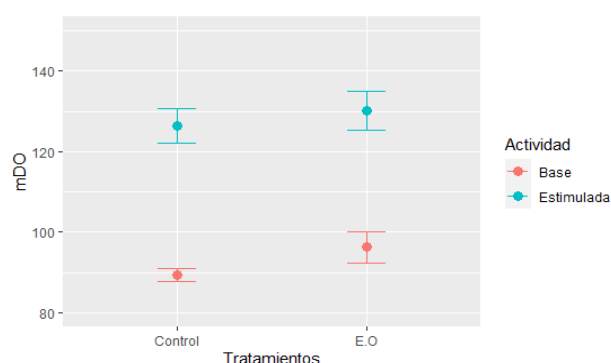
Nota: La figura muestra los niveles de producción de O_2^- en camarones del grupo control y tratados con extracto de orégano, evaluados en condiciones basales y estimuladas. En este parámetro no se observaron diferencias significativas ($p > 0.01$) entre los camarones tratados y los del control.

La producción de anión superóxido O_2^- , es un indicador clave de la respuesta inmunitaria oxidativa en crustáceos, y esta fue evaluada mediante dos enfoques, la tasa de activación, así como los valores netos de actividad basal y actividad estimulada. En el primer análisis, se comparó la actividad en condiciones basales y estimuladas tanto en camarones tratados con extracto de orégano (E.O) como en el grupo control es decir sin orégano. Se observó que la actividad del anión superóxido fue mayor bajo condición estimulada en ambos

tratamientos, destacando un aumento ligeramente superior en el grupo tratado, lo cual sugiere una mayor capacidad de respuesta inmune frente a estímulos. Asimismo, en condición basal, los camarones tratados también presentaron una producción levemente más alta en comparación con los no tratados.

Figura 19

Generación de O₂⁻ estimulada y basal de camarones tratados y no tratados con extracto de orégano.



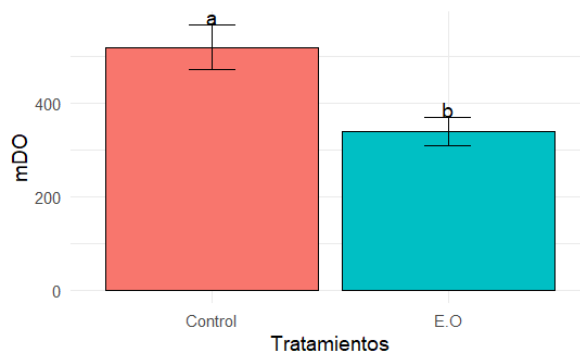
Nota: La figura muestra la generación de O₂⁻ entre camarones del grupo control y aquellos tratados con extracto de orégano. Las barras representan la media ± desviación estándar.

Por otro lado, en la figura 19, se evidencia que en este parámetro no se detectaron diferencias significativas en generación en tasas de generación de O₂⁻, indicando que los antioxidantes del orégano no afectaron la generación de superóxido relacionado al choque respiratorio. Sin embargo, si se observa un ligero aumento en actividad basal en los camarones tratados.

3.6.2 Activación de la fenoloxidasa de camarones tratados y no tratados

Figura 20

Activación de PO en función del tratamiento



Nota: Activación de la fenoloxidasa (mDO) en camarones del grupo control y tratados con extracto de orégano (E.O). Las diferentes letras en este caso a y b indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

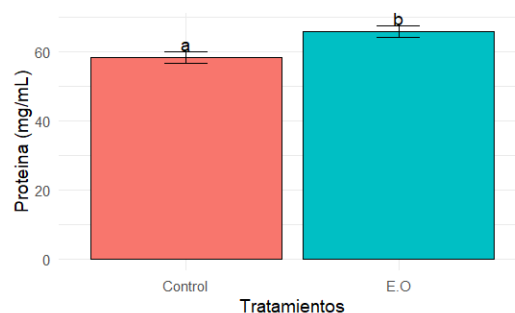
Como se observa en la figura 20, la activación de la PO en camarones del grupo control y en aquellos tratados con extracto de orégano. Se puede evidenciar una disminución significativa en la actividad enzimática en el grupo tratado, en comparación con el control, como lo indican las letras distintas sobre las barras (a y b), reflejando una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). La menor actividad de la PO en los camarones tratados podría interpretarse como un efecto inmunomodulador del orégano, que mantiene la respuesta inmune controlada bajo condiciones no patológicas.

3.6.3 Cuantificación de proteínas de camarones tratados y no tratados

Cuantificación de proteínas totales (mg/mL) en camarones control y tratados con extracto de orégano.

Figura 21

Comparación estadística de la concentración de proteínas totales entre los camarones control y los tratados con extracto de orégano



Nota: La figura muestra la concentración promedio de proteínas totales (mg/mL) en camarones del grupo control y tratados con extracto de orégano. Las diferentes letras (a, b) indican diferencias estadísticas entre tratamientos ($p < 0.05$).

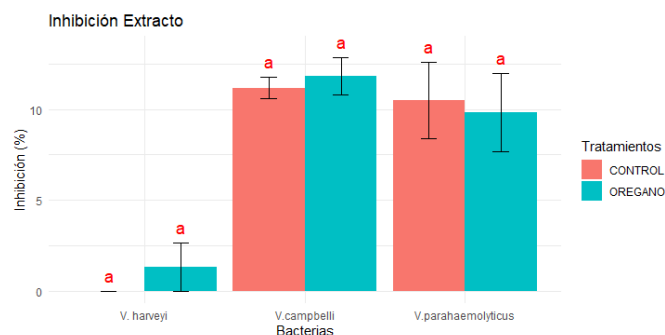
En la figura 21, se observa una diferencia significativa en la concentración de proteínas totales entre los grupos analizados. Los camarones tratados con extracto de orégano presentan un valor promedio significativamente mayor (superior a 65 mg/mL) en comparación con el grupo control (alrededor de 59 mg/mL). Las letras distintas sobre las barras (a y b) confirman una diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ($p < 0.05$). Este resultado sugiere que el extracto de orégano podría promover la síntesis o acumulación de proteínas totales, lo que puede estar relacionado con una mejora en el estado fisiológico o inmunológico de los organismos tratados.

3.6.4 Comparación de camarones tratados y no tratados mediante test antibacteriano

La evaluación de la actividad antibacteriana del plasma y el extracto de hemocitos permite conocer la capacidad del sistema inmune de los camarones para inhibir el crecimiento de patógenos, particularmente bacterias del género *Vibrio*. En este trabajo, se analizaron muestras de camarones tratados con extracto de orégano y no tratados, con el fin de determinar si dicho tratamiento mejora el efecto inhibitorio frente a *V. campbellii*, *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*.

Figura 22

Porcentaje de inhibición de extractos de hemocitos contra tres vibrios patógenos frente a diferentes cepas de Vibrio según el tratamiento



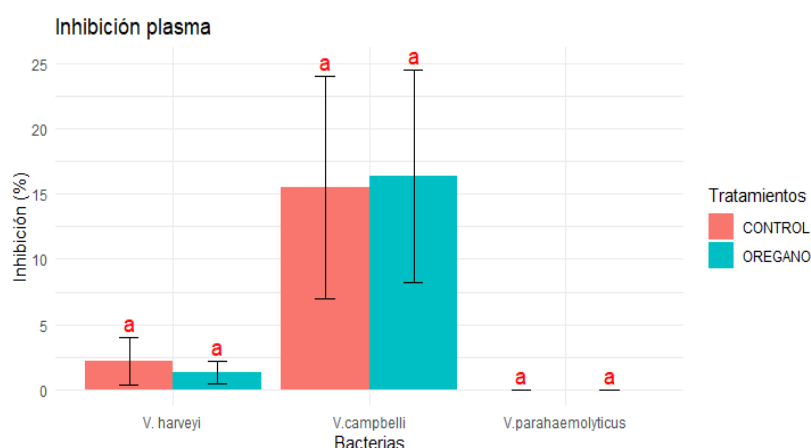
Nota: Se comparan los porcentajes de inhibición frente a *V. harveyi*, *V. campbellii* y *V. parahaemolyticus* entre grupos tratados y control. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas.

La figura 22 muestra la comparación del porcentaje de inhibición bacteriana ejercida por muestras de camarones del control y aquellos tratados con extracto de orégano, frente a tres cepas del género *Vibrio*. En términos generales, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada especie bacteriana, lo que indica que el extracto de orégano no aumentó de manera significativa la capacidad inhibitoria frente a ninguna de las cepas evaluadas.

Sin embargo, al comparar entre especies, se observa que *Vibrio campbellii* presentó una inhibición significativamente mayor ($p < 0.001$), independientemente del tratamiento, en comparación con *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*. Esto confirma que el sistema inmune del camarón ya sea tratado o no, tiene mayor eficacia natural contra *V. campbellii*.

Figura 23

Porcentaje de inhibición del plasma contra tres vibrios patógenos frente a diferentes cepas de Vibrio según el tratamiento.



Nota: Porcentaje de inhibición bacteriana del plasma frente a tres especies de *Vibrio* *V. harveyi*, *V. campbellii* y *V. parahaemolyticus* en dos tratamientos: control y extracto de orégano. Las barras representan la media $\pm$ desviación estándar. Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$).

En el análisis de la figura 23, la actividad inhibitoria del plasma frente a cepas patógenas de *Vibrio* evidenció una respuesta diferencial dependiente de la especie bacteriana. La mayor inhibición se registró contra *V. campbellii*, con valores promedio superiores al 15 % tanto en el grupo control como en el tratado con extracto de orégano. En el caso de *V. harveyi*, la actividad inhibitoria fue significativamente menor ($<5\%$), mientras que frente a *V. parahaemolyticus* no se detectó efecto inhibitorio relevante. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre tratamientos, lo que indica que la suplementación con orégano no potenció la capacidad antimicrobiana basal del plasma en las condiciones experimentales evaluadas. Estos resultados sugieren que el efecto inhibitorio plasmático en *P. vannamei* es más específico hacia ciertas especies de *Vibrio* y no se ve modulado de manera significativa por el extracto vegetal bajo el diseño experimental aplicado. Sin embargo, no debe descartarse que los vibrios patógenos dispongan de mecanismos de evasión inmune.

3.7 Análisis

En este estudio se trabajó en la estandarización de un ensayo antibacteriano para evaluar la capacidad antivibrio de la hemolinfa de camarón. Los resultados indicaron una mayor sensibilidad de *V. campbelli* en comparación a *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*. Como paso previo se estandarizaron las condiciones adecuadas de cremiento bacteriano para esto se diseñó un medio de cultivo similar a la hemolinfa. El método fue validado en bioensayo en piscina. En los animales expuestos se evaluó el efecto del extracto de orégano sobre varios parámetros inmunes, incluyendo la prueba antibacteriana en *P. vannamei*. Antes de realizar esta validación se optimizó la concentración de extracto de orégano mediante ensayos inmunológicos y antibacterianos in vitro encontrando que el extracto completo dio mejores resultados inhibitorios contra los vibrios e inmunomoduladores y que dilución adecuada estaba entre 1/10 y 1/100. A esta dilución la respuesta inmune es modulada y se observa un efecto antivibrio. Por lo que se decidió usar en piscina 40 ml de extracto concentrado/kg de alimento.

En piscina el tratamiento indujo un aumento significativo en la concentración de proteínas totales, lo que sugiere una estimulación metabólica relacionada con la síntesis de componentes inmunitarios, como ha sido reportado en otros estudios con extractos vegetales en especies acuáticas (Sutili et al., 2018). La activación de la PO fue significativamente menor en los animales tratados, lo que indica un efecto modulador o regulador del extracto sobre esta vía en ausencia de infección activa, evitando respuestas inflamatorias innecesarias como han sugerido estudios previos sobre el uso de aceites esenciales en crustáceos (Reverter et al., 2014). En relación con la producción de especies reactivas de oxígeno (anión superóxido), no se observaron diferencias entre grupos, lo que indica que el extracto no altera el equilibrio redox basal, manteniendo un nivel de defensa oxidativa adecuado sin inducir daño celular (Dawood et al., 2017), al contrario la actividad basal de superóxido se incrementó ligeramente. Respecto a la actividad antibacteriana frente a cepas de *Vibrio*, se

observó una inhibición leve y consistente frente a *V. campbellii*, aunque sin diferencias significativas entre tratamientos. Esto sugiere que el orégano no potencia directamente esta capacidad antimicrobiana bajo condiciones no desafiantes, en línea con otros estudios que señalan que el efecto depende de variables como la dosis, la vía de administración y el tiempo (Al-Sagheer et al., 2018). Sin embargo, se debe considerar que los vibrios constituyen hospederos habituales del camarón y es muy posible que posean los mecanismos de evasión inmune. Por lo que es necesario replicar el ensayo en otra especie bacteriana como *E.coli* D31. La supervivencia fue mayor en los camarones tratados con extracto de orégano que en los no tratados. En suma, el uso del extracto de orégano presentó indicios de modulaciones favorables en la inmunidad innata del camarón sin provocar una activación exagerada del sistema inmune, lo que sugiere que este aditivo potencialmente puede contribuir al mantenimiento de la homeostasis inmune en contextos de cultivo, aunque es necesario validar estos efectos en condiciones de desafío patogénico y mediante estudios moleculares más detallados.

Conclusiones y Recomendaciones

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio permiten concluir que la inclusión de extracto de orégano en la dieta o tratamiento de camarones puede ejercer un efecto modulador sobre diversos parámetros del sistema inmune innato.

Se observó un incremento significativo en la concentración de proteínas totales en los camarones tratados con el extracto de orégano, lo que sugiere una mejora en el estado fisiológico general y en la síntesis de proteínas asociadas a mecanismos de defensa, tales como las enzimas y péptidos antimicrobianos. Este resultado indica que el extracto de orégano puede contribuir a mantener o fortalecer la salud inmune de los organismos bajo condiciones normales de cultivo.

Por otro lado, la activación de la PO disminuyó en los camarones tratados, lo que podría interpretarse como una regulación controlada del sistema inmune, evitando una activación excesiva del sistema proPO en ausencia de patógenos. Esto refleja un posible efecto antioxidante e inmunomodulador del extracto de orégano. La generación de O₂⁻ y la supervivencia no fueron afectadas por los antioxidantes del *O. Vulgare* indicando que el efecto sobre la PO no tuvo connotaciones negativas.

Respecto a la actividad antibacteriana, se observó una inhibición moderada del crecimiento de cepas patógenas del género *Vibrio*, especialmente en los extractos de hemocitos de los camarones tratados, con un patrón más consistente frente a *Vibrio campbellii*. Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y tratado, lo que sugiere que el extracto de orégano no tiene un efecto directo relevante sobre la capacidad antimicrobiana de la hemolinfa en condiciones sin desafío o que los vibrios pueden evadir la capacidad antimicrobiana del camarón.

En conjunto, los hallazgos sugieren que el extracto de orégano puede actuar como un inmunomodulador natural en camarones, contribuyendo a mantener el equilibrio de la respuesta inmune, sin inducir estrés fisiológico. Estos efectos podrían ser beneficiosos en condiciones reales de cultivo, especialmente en ambientes con alta carga microbiana o en presencia de desafíos infecciosos.

4.2 Recomendaciones

Se recomienda realizar estudios adicionales en los que se exponga a los camarones tratados a un desafío bacteriano controlado (por ejemplo, con cepas virulentas de *Vibrio*), para determinar si el extracto de orégano puede potenciar efectivamente la resistencia frente a infecciones reales y reducir la mortalidad asociada.

El extracto de orégano si afectó a los vibrios a las dosis utilizadas, por lo que sería pertinente evaluar su efecto sobre el microbiota de camarón. Sería pertinente complementar estos estudios con análisis moleculares, como la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune, para comprender mejor los mecanismos de acción del extracto de orégano a nivel celular y genético.

Es fundamental estandarizar la dosis y vía de aplicación del extracto de orégano, ya sea como suplemento alimenticio o tratamiento en agua. En agua se recomienda realizar ensayos con diferentes concentraciones para establecer la dosis más efectiva que equilibre la estimulación inmune sin inducir toxicidad o efectos negativos.

Para validar la aplicabilidad práctica del uso de orégano como inmunoestimulante en acuicultura, se sugiere realizar ensayos de larga duración en sistemas de cultivo comerciales, incluyendo variables como ganancia de peso, supervivencia, conversión alimenticia y costos de producción.

Aunque el extracto de orégano es considerado seguro, se recomienda estudiar posibles efectos adversos a nivel hepático, intestinal o en el microbiota del camarón, especialmente si se combina con otros aditivos o antibióticos en la dieta.

Además del potencial inmunomodulador, sería interesante investigar otras propiedades del extracto, como su efecto antioxidante, con el fin de ampliar su posible uso multifuncional en la salud acuícola.

5. Referencias

- Abdel-Latif, H. M. R., Yilmaz, E., Dawood, M. A. O., Ringø, E., Ahmadifar, E., & Yilmaz, S. (2022a). Shrimp vibriosis and possible control measures using probiotics, postbiotics, prebiotics, and synbiotics: A review. *Aquaculture*, 551, 737951. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.737951>
- Abdel-Latif, H. M. R., Yilmaz, E., Dawood, M. A. O., Ringø, E., Ahmadifar, E., & Yilmaz, S. (2022b). Shrimp vibriosis and possible control measures using probiotics, postbiotics, prebiotics, and synbiotics: A review. *Aquaculture*, 551, 737951. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.737951>
- Acebo-González, D., & Hernández-García, A. T. (2013). Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 44(1), undefined. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181226886003>
- Agurto-Rodríguez, G., Domínguez-Borbor, C., Tomalá-Beltrán, C., Malavé, R., & Rodríguez, J. (2022). Immunomodulatory and anti-vibrio properties of plant extract to manage the health of the shrimp *Penaeus vannamei*. *AquaTechnica*, 4(2), 109–123. <https://doi.org/10.33936/at.v4i2.4776>
- Alejandra, K., Marfileño, S., & Silva, L. G. (2023). Necrosis hepatopancreática aguda en camarón: prevención y alternativa terapéutica. *Revista CienciaUANL*, 26(120), 24–29. <https://doi.org/10.29105/cienciauanl26.120-3>
- Al-Sagheer, A. A., Mahmoud, H. K., Reda, F. M., Mahgoub, S. A., & Ayyat, M. S. (2018). Supplementation of diets for *Oreochromis niloticus* with essential oil extracts from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and geranium (*Pelargonium graveolens*) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidant and immune activities. *Aquaculture*

Nutrition, 24(3), 1006–1014.

<https://doi.org/10.1111/ANU.12637>;WGROU:STRING:PUBLICATION

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79.
<https://doi.org/10.1016/J.JPHA.2015.11.005>

Blank, D. E., De Oliveira Hübner, S., Alves, G. H., Lima Cardoso, C. A., Freitag, R. A., & Cleff, M. B. (2019). Chemical Composition and Antiviral Effect of Extracts of *Origanum vulgare*. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 10, 188–196.
<https://doi.org/10.4236/abb.2019.107014>

Cervato, G., Carabelli, M., Gervasio, S., Cittera, A., Cazzola, R., & Cestaro, B. (2000). ANTIOXBDANT PROPERTIES OF OREGANO (ORIGANUM VULGARE) LEAF EXTRACTS. *Journal of Food Biochemistry*, 24(6), 453–465.
<https://doi.org/10.1111/J.1745-4514.2000.TB00715.X>

Darshanee Ruwandeeepika, H. A., Sanjeeva Prasad Jayaweera, T., Paban Bhowmick, P., Karunasagar, I., Bossier, P., & Defoirdt, T. (2012). Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the Harveyi clade. *Reviews in Aquaculture*, 4(2), 59–74. <https://doi.org/10.1111/J.1753-5131.2012.01061.X>

Dawood, M. A. O., Koshio, S., & Esteban, M. Á. (2017). Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 10(4), 950–974.
<https://doi.org/10.1111/RAQ.12209>

Destoumieux-Garzón, D., Saulnier, D., Garnier, J., Jouffrey, C., Bulet, P., & Bachère, E. (2001). Crustacean immunity. *Journal Of Biological Chemistry*, 276(50), 47070–47077. <https://doi.org/10.1074/jbc.m103817200>

FAO. (2022). *Informe de la FAO: La producción pesquera y acuícola mundial alcanza un nivel sin precedentes*. <https://www.fao.org/newsroom/detail/fao-report-global-fisheries-and-aquaculture-production-reaches-a-new-record-high/es>

Fernanda Alvarado-Barrera, L., Verónica Félix-Zambrano, M., Superior Tecnológico Vicente Rocafuerte -Ecuador, I., Miguel Zambrano-Sánchez, R., & de los Ángeles Chávez-Naranjo, M. (2024). Exportación del camarón y su impacto a la economía ecuatoriana en el periodo 2019-2023. *593 Digital Publisher CEIT*, 9(5), 190–199. <https://doi.org/10.33386/593DP.2024.5.2581>

García-Bernal, M., Medina-Marrero, R., Campa-Córdova, Á. I., Tovar-Ramírez, D., Barajas, D., Ormart-Castro, P., & Mazón-Suástegui, J. M. (2020). Crecimiento y supervivencia del camarón *Penaeus vannamei* con aplicación de actinomicetos probióticos y homeopatía. *AquaTechnica: Revista Iberoamericana de Acuicultura.*, 2(2), 76. <https://doi.org/10.33936/AT.V2I2.2676>

González, R., Brokordt, K., Cárcamo, C. B., Coba de la Peña, T., Oyanedel, D., Mercado, L., & Schmitt, P. (2017). Molecular characterization and protein localization of the antimicrobial peptide big defensin from the scallop *Argopecten purpuratus* after *Vibrio splendidus* challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, 68, 173–179. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2017.07.010>

Gracia-Valenzuela, M. H., Arias-Moscoso, J. L., Ochoa-Meza, A. R., & Escobedo-Bonilla, C. M. (2022a). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of two types of oregano (*Lippia berlandieri*) essential oils against bacteria from shrimp ponds. *Revista Bio Ciencias*, 9. <https://doi.org/10.15741/REVBIO.09.E1344>

Gracia-Valenzuela, M. H., Arias-Moscoso, J. L., Ochoa-Meza, A. R., & Escobedo-Bonilla, C. M. (2022b). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of two types of oregano

- (*Lippia berlandieri*) essential oils against bacteria from shrimp ponds. *Revista Bio Ciencias*, 9. <https://doi.org/10.15741/REVBIO.09.E1344>
- Guevara Toscana, M. E., Palma Caicedo, T. A., & Cabrera Enríquez, D. M. (2024). Impacto económico y ambiental generado por el sector camaronero del Ecuador. *STRATEGOS - Revista Internacional de Estudios En Ciencias Administrativas*, 1(2), 15. <https://doi.org/10.53591/STRATEGOS.V1I2.1844>
- Ingraham, L. L., & Meyer, D. L. (1985). Hemocyanin: A Biological Copper Dioxygen Carrier. *Biochemistry of Dioxygen*, 135–138. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2475-1_10
- Kazuń, B., Kazuń, K., & Siwicki, A. K. (2019). Diseases of shrimps and natural methods to protect their health. *Medycyna Weterynaryjna*, 75(4), 209–213. <https://doi.org/10.21521/MW.6154>
- Kongrueng, J., Yingkajorn, M., Bunpa, S., Sermwittayawong, N., Singkhamanan, K., & Vuddhakul, V. (2015). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in southern Thailand. *Journal of Fish Diseases*, 38(11), 957–966. <https://doi.org/10.1111/JFD.12308>
- Kulkarni, A., Krishnan, S., Anand, D., Kokkattunivarthil Uthaman, S., Otta, S. K., Karunasagar, I., & Kooloth Valappil, R. (2021). Immune responses and immunoprotection in crustaceans with special reference to shrimp. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 431–459. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12482>
- Kumar, R., Ng, T. H., & Wang, H. C. (2020). Acute hepatopancreatic necrosis disease in penaeid shrimp. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1867–1880. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12414;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER>

- Kumar, V., Roy, S., Behera, B. K., Bossier, P., & Das, B. K. (2021). Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND): Virulence, Pathogenesis and Mitigation Strategies in Shrimp Aquaculture. *Toxins* 2021, Vol. 13, Page 524, 13(8), 524.
<https://doi.org/10.3390/TOXINS13080524>
- Lee, C. Te, Chen, I. T., Yang, Y. T., Ko, T. P., Huang, Y. T., Huang, J. Y., Huang, M. F., Lin, S. J., Chen, C. Y., Lin, S. S., Lightner, D. V., Wang, H. C., Wang, A. H. J., Wang, H. C., Hor, L. I., & Lo, C. F. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(34), 10798–10803.
https://doi.org/10.1073/PNAS.1503129112/SUPPL_FILE/PNAS.201503129SI.PDF
- Lotz, J. M. (1997). Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(4), 405–413.
<https://doi.org/10.1023/A:1018572132529/METRICS>
- Matos, G. M., Garcia-Teodoro, B., Martins, C. P., Schmitt, P., Guzmán, F., de Freitas, A. C. O., Stoco, P. H., Ferreira, F. A., Stadnik, M. J., Robl, D., Perazzolo, L. M., & Rosa, R. D. (2023). Antimicrobial Spectrum of Activity and Mechanism of Action of Linear Alpha-Helical Peptides Inspired by Shrimp Anti-Lipopolysaccharide Factors. *Biomolecules*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/BIOM13010150>,
- Mcfarland, J. (1907). The nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association*, XLIX(14), 1176–1178.
<https://doi.org/10.1001/JAMA.1907.25320140022001F>

- Minjarez-Osorio, C., Serna-Medina, M. G., de la Re-Vega, E., Martínez-Durazo, Á., Gallardo-Ybarra, C., Castro-Longoria, R., & Grijalva-Chon, J. M. (2024). Compuestos herbales: Una alternativa en el control de la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND). *Recursos Naturales y Sociedad*, 10(1), 33–52.
<https://doi.org/10.18846/RENAYSOC.2024.10.10.01.0004>
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., Van Der Knaap, W. P. W., Mialhe, E., & Bachère, E. (2000). Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 191(1–3), 89–107.
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00420-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00420-8)
- National Geographic. (2025, February 5). *Acuicultura: qué es y qué problemas tiene* | National Geographic. <https://www.nationalgeographic.es/medio-ambiente/acuicultura>
- Natrah, I., Muthukrishnan, S., Mohd-Padil, H., Mohamad, N., Alipiah, N. M., Shariff, M., Yusoff, F. M., Yasin, I. S. M., Devadas, S. D., Omar, W. H. H. W., Wan Ibrahim, W. N., & Defoirdt, T. (2025). Antimicrobial Resistance in Malaysian Shrimp Aquaculture and Strategies to Reduce Its Occurrence. *Reviews in Aquaculture*, 17(3).
<https://doi.org/10.1111/RAQ.70020>
- Nelson Peña-Navarro. (2015). *Análisis histopatológico en Litopenaeus vannamei infectado con Vibrio parahaemolyticus*.
https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212015000100005
- Noble, J. E., & Bailey, M. J. A. (2009). Chapter 8 Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology*, 463(C), 73–95. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63008-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63008-1)
- Qiu, C., Sun, J., Liu, M., Wang, B., Jiang, K., Sun, S., Meng, X., Luo, Z., & Wang, L. (2014). Molecular Cloning of Hemocyanin cDNA from *Fenneropenaeus chinensis* and

- Antimicrobial Analysis of Two C-terminal Fragments. *Marine Biotechnology*, 16(1), 46–53. <https://doi.org/10.1007/S10126-013-9519-Y>,
- Ramón, B., Guerrero, C., Independiente, I., Kléver, E., Verduga Vélez, J., Janeth, M., & Cedeño, F. (2024). Estrategias Lúdicas Digitales para el Mejoramiento del Proceso de Aprendizaje en los Estudiantes de Básica Superior en 8vo Año. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 8(1), 6645–6660. https://doi.org/10.37811/CL_RCM.V8I1.10027
- Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., & Sasal, P. (2014). Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture.*, 433, 50–61. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2014.05.048>
- Rozirwan, ., Iskandar, I., Hendri, M., Apri, R., & Azhar, N. (2018). ANTIBACTERIAL ACTIVITY AS INHIBITORS PATHOGEN BACTERIAL ON POND SHRIMP OF EXTRACT MARINE BIOTA COLLECTED FROM MASPARI ISLAND, SOUTH SUMATERA, INDONESIA. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Kelautan Tropis*, 10(3), 617–627. <https://doi.org/10.29244/JITKT.V10I3.22997>
- Sampaio, A., Silva, V., Poeta, P., & Aonofriesei, F. (2022). *Vibrio* spp.: Life Strategies, Ecology, and Risks in a Changing Environment. *Diversity 2022, Vol. 14, Page 97, 14*(2), 97. <https://doi.org/10.3390/D14020097>
- Sutuli, F. J., Gatlin, D. M., Heinzmann, B. M., & Baldisserotto, B. (2018). Plant essential oils as fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), 716–726. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12197>
- Varela, A., Choc-Martínez, L. F., Varela, A., & Choc-Martínez, L. F. (2020). Técnicas diagnósticas para enfermedades bacterianas en camarones. Usos, alcances y

limitaciones. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 31(3), 18165.

<https://doi.org/10.15381/RIVEP.V31I3.18165>

Velásquez López, P. C., Solorzano Reyes, F., Ochoa Pereira, P. M., Solano Motoche, G. W., Quizhpe Cordero, P., & Guillen Añasco, R. M. (2023). Caracterización de la calidad del agua durante el cultivo del camarón *Litopenaeus vannamei* con agua dulce en el Sur del Ecuador. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, ISSN-e 2311-2581, ISSN 2311-3766, Vol. 10, N°. 2, 2023, Págs. 74-87, 10(2), 74–87.

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=10052615&info=resumen&idioma=ENG>

Zhang, S., Wang, Z., & Wang, H. (2013). Maternal immunity in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 39(1–2), 72–78. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2012.02.009>